



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL NEUROPROTETOR DO ZINCO E DA QUERCETINA EM MODELOS DE ISQUEMIA E ESTRESSE OXIDATIVO

MARINA MÔNICA BAHL

Orientador: Dr. Alcir Luiz Dafre

Co-Orientadora: Dra. Carla Inês Tasca

Florianópolis, dezembro de 2007.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL NEUROPROTETOR
DO ZINCO E DA QUERCETINA EM MODELOS DE
ISQUEMIA E ESTRESSE OXIDATIVO**

MARINA MÔNICA BAHL

Orientador: Dr. Alcir Luiz Dafre

Departamento de Ciências Fisiológicas

Co-Orientadora: Dra. Carla Inês Tasca

Departamento de Bioquímica

**Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação
em Neurociências da Universidade Federal de Santa
Catarina, como requisito parcial à obtenção do Grau
de Mestre.**

Florianópolis, dezembro de 2007.

AGRADECIMENTOS

À Deus por estar sempre presente em minha vida, auxiliando e amparando nas horas mais difíceis.

À minha família, principalmente a minha mãe, que sempre me socorreu nos momentos em que mais precisei, apoiando e incentivando. Te amo!

Aos meus irmãos, Maurício e Tiago, pela ajuda especial.

Ao meu pai, Maurício, que mesmo não estando presente fisicamente, estará presente em minha vida com seus ensinamentos e valores repassados, para sempre.

Em especial ao meu amor Daniel pelo apoio, incentivo, por ter tido muita paciência e por estar sempre presente ao meu lado nas alegrias e nas tristezas. Te amo muito!

Ao meu orientador, Prof. Alcir, por ter aceitado minha orientação, pela paciência em ensinar, pela confiança depositada e toda ajuda prestada em todos os momentos, principalmente na reta final.

À co-orientadora, Profa. Carla, que foi mesmo uma orientadora, pela colaboração, ensinamentos, paciência e atenção.

À minha amiga Scheyla por ajuda, incentivo e amizade em todos os momentos. Você é muito especial!

Aos amigos Samuel e Marcos Godinho por toda colaboração e amizade.

Ao pessoal do laboratório da Profa. Carla: Simone, Bruno, Ellen, Tetsadê e principalmente a Tharine, por ajuda nos experimentos, nos cálculos, nas soluções, etc e por toda a conversa e descontração que também são necessárias.

Ao pessoal do laboratório do Prof. Alcir: Jéferson, Trevisan, Marcela, Pércles e principalmente ao Luiz por ajuda, principalmente nos experimentos finais.

Às meninas do laboratório da Profa. Ana Lúcia: Danielle, Josiane e Patrícia por auxiliar nos esclarecimentos e por todo apoio.

Ao secretário da Pós-graduação, Nivaldo, pela ajuda e colaboração, sempre disposto a auxiliar no que fosse preciso.

Aos colegas e professores do curso de Pós-graduação em Neurociências.

Ao pessoal do Biotério Central, principalmente a Jô, pela colaboração e cuidados com os animais tão necessários.

E principalmente aos animais (ratos utilizados nesta pesquisa) que sem suas colaborações nenhum destes experimentos e conseqüentemente toda a pesquisa não seria possível.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	iii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	iv
RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Metabolismo Oxidativo	1
1.1.1. Espécies Reativas de Oxigênio e Estresse Oxidativo	1
1.1.2. Defesas Antioxidantes	2
1.2. Isquemia Cerebral.....	6
1.3. Estratégias Neuroprotetoras.....	11
1.3.1. Zinco.....	11
1.3.1.1. Papel Fisiológico do Zn^{2+} no SNC	14
1.3.1.2. Mobilização intracelular de Zn^{2+}	15
1.3.1.3. Zn^{2+} na isquemia.....	16
1.3.2 Flavonóides e quercetina	20
1.3.2.1. Flavonóides.....	20
1.3.2.2. Quercetina.....	22
2. OBJETIVOS	26
2.1. Objetivo Geral	26
2.2. Objetivos Específicos	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1. Animais.....	27
3.2. Modelo de isquemia in vitro.....	27
3.3. Tratamento in vivo com Zn^{2+} e o modelo de isquemia ex vivo	28
3.4. Tratamento in vitro com Zn^{2+} e o modelo de isquemia in vitro	29
3.5. Tratamento in vitro com quercetina e o modelo de isquemia in vitro.....	32
3.6. Tratamento in vitro com quercetina e o modelo de estresse oxidativo	33
3.7. Avaliação da viabilidade celular	36
3.8. Avaliação da permeabilidade celular.....	36
3.9. Preparação das amostras para análise de glutathiona e tióis protéicos.....	37
3.9.1. Mensuração dos níveis de glutathiona total (GSH-t)	37
3.9.2. Quantificação dos tióis protéicos (PSH).....	39
3.10. Preparação das amostras para avaliação da atividade das enzimas antioxidantes	39
3.10.1. Avaliação da atividade da enzima glutathiona peroxidase (GPx)	40
3.10.2. Avaliação da atividade da enzima glutathiona redutase (GR).....	40
3.10.3. Avaliação da atividade da enzima glutathiona S-transferase (GST)	41
3.10.4. Avaliação da atividade da enzima γ -glutamyl transpeptidase (GGT)	42
Reação 6 – Atividade γ -glutamyl transpeptidase (GGT) no meio de reação	42
3.10.5. Avaliação da atividade da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH).....	42
3.11. Análise estatística	43

4. RESULTADOS.....	44
4.1. Efeito do tratamento in vivo com ZnCl ₂ e o modelo de isquemia ex vivo.....	44
4.2. Efeito do tratamento in vitro com ZnCl ₂ e o modelo de isquemia in vitro.....	51
4.3. Efeito da resposta à PGO pelo tratamento in vitro com inibidores da glutathione redutase: ZnCl ₂ e BCNU	59
4.4. Efeito do tratamento in vitro com quercetina e o modelo de isquemia in vitro ..	66
4.5. Efeito do tratamento in vitro com quercetina e o modelo de estresse oxidativo .	71
5. DISCUSSÃO	76
5.1. Considerações gerais	76
5.2. Efeito do tratamento in vivo com ZnCl ₂ e o modelo de isquemia ex vivo.....	78
5.3. Efeito do tratamento in vitro com ZnCl ₂ e o modelo de isquemia in vitro.....	80
5.4. Inibição da glutathione redutase como via responsável pela ação citotóxica do ZnCl ₂	82
5.5. O papel neuroprotetor da quercetina no modelo de isquemia in vitro.....	83
5.6. O papel neuroprotetor da quercetina no modelo de estresse oxidativo	86
6. CONCLUSÕES	89
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo redox da Glutathiona.....	4
Figura 2: Síntese da Glutathiona.....	4
Figura 3: Excitotoxicidade.....	9
Figura 4: Transporte de Zn^{2+} nas células do SNC.....	14
Figura 5: Zn^{2+} na isquemia.....	18
Figura 6: Estrutura do flavonóide quercetina.....	22
Figura 7. Avaliação da viabilidade celular em fatias de hipocampo de ratos, tratados por 30 dias com $ZnCl_2$ (300 mg/L; p.o.), submetidas <i>in vitro</i> a PGO.....	45
Figura 8. Avaliação da permeabilidade celular em fatias de hipocampo de ratos tratados por 30 dias com $ZnCl_2$ (300 mg/L, p.o.), e submetidas <i>in vitro</i> a PGO por 15 (A) ou 60 (B) minutos.....	47
Figura 9. Determinação do conteúdo de GSH-t em fatias de hipocampo de ratos submetidas PGO por 15 (A) ou 60 (B) minutos no tratamento <i>in vivo</i> com $ZnCl_2$ (300 mg/L; p.o.).....	49
Figura 10. Determinação do conteúdo de PSH em fatias de hipocampo de ratos submetidas a 15 (A) ou 60 (B) minutos de PGO no tratamento <i>in vivo</i> com $ZnCl_2$ (300mg/L; p.o.).....	50
Figura 11. Avaliação da viabilidade celular em fatias de hipocampo de ratos submetidas a 15 (A) ou 60 (B) minutos de PGO no tratamento <i>in vitro</i> com $ZnCl_2$	52
Figura 12. Avaliação da permeabilidade celular em fatias de hipocampo de ratos submetidas a 15 (A) ou 60 (B) minutos de PGO no tratamento <i>in vitro</i> com $ZnCl_2$	55
Figura 13. Determinação do conteúdo de GSH-t em fatias de hipocampo de ratos submetidas a 15 (A) ou 60 (B) minutos de PGO no tratamento <i>in vitro</i> com $ZnCl_2$	57
Figura 14. Determinação do conteúdo de PSH em fatias de hipocampo de ratos submetidas a 15 (A) ou 60 (B) minutos de PGO no tratamento <i>in vitro</i> com $ZnCl_2$	58

Figura 15. Ação do ZnCl_2 (A) ou do BCNU (B) sobre a atividade da enzima glutathiona redutase (GR) em fatias de hipocampo de ratos.....	61
Figura 16. Avaliação da viabilidade (A) e da permeabilidade (B) celular em fatias de hipocampo de ratos na presença de carmustina e submetidas a 15 minutos de PGO.....	62
Figura 17. Ação do ZnCl_2 ou BCN sobre a atividade das enzimas glutathiona peroxidase e glutathiona S-transferase em fatias de hipocampo de ratos.....	64
Figura 18. Ação do ZnCl_2 ou BCNU sobre a atividade das enzimas γ -glutamyl transpeptidase (GGT) e glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) em fatias de hipocampo de ratos.....	65
Figura 19. Avaliação da viabilidade celular em fatias de hipocampo de ratos submetidas a 15 minutos de PGO no tratamento <i>in vitro</i> com quercetina.....	67
Figura 20. Avaliação da permeabilidade celular em fatias de hipocampo de ratos submetidas a 15 minutos de PGO no tratamento <i>in vitro</i> com quercetina.....	69
Figura 21. Correlação entre a permeabilidade (liberação de LDH) e viabilidade (redução do MTT) celular em fatias de hipocampo de ratos submetidas a 15 minutos de PGO no tratamento <i>in vitro</i> com quercetina.....	69
Figura 22. Determinação do conteúdo de GSH-t em fatias de hipocampo de ratos submetidas a 15 minutos de PGO no tratamento <i>in vitro</i> com quercetina.....	70
Figura 23. Determinação do conteúdo dos PSH em fatias de hipocampo de ratos submetidas a 15 minutos de PGO no tratamento <i>in vitro</i> com quercetina.....	71
Figura 24. Avaliação da viabilidade celular em fatias de hipocampo de ratos submetidas a H_2O_2 no tratamento <i>in vitro</i> com quercetina.....	73
Figura 25. Determinação do conteúdo de GSH-t em fatias de hipocampo de ratos submetidas a submetidas a H_2O_2 a 0,25 mM e 1 mM no tratamento <i>in vitro</i> com quercetina.....	74
Figura 26. Determinação do conteúdo de PSH em fatias de hipocampo de ratos submetidas a submetidas a H_2O_2 a 0,25, 1 e 2,5 mM no tratamento <i>in vitro</i> com quercetina.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Grupos experimentais no tratamento <i>in vivo</i> com ZnCl ₂ seguido do tratamento <i>in vitro</i> no modelo de isquemia.....	29
Tabela 2. Grupos experimentais no tratamento com <i>in vitro</i> com ZnCl ₂ seguido do tratamento <i>in vitro</i> no modelo de isquemia.....	31
Tabela 3. Grupos experimentais no tratamento <i>in vitro</i> com quercetina seguido do tratamento <i>in vitro</i> no modelo de isquemia.....	33
Tabela 4. Grupos experimentais no tratamento <i>in vitro</i> com quercetina seguido do tratamento <i>in vitro</i> no modelo de estresse oxidativo.....	35
Tabela 5. Resumo dos resultados obtidos.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPA – ácido alfa-amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazolepropionico	MTT – brometo de 3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio azul de tiazolil ou Thiazolyl blue
ATP – adenosina-5'-trifosfato	NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
Ca²⁺ – cálcio livre	
CAT – catalase	NMDA – N-metil-D-aspartato
ERO – espécies reativas de oxigênio	NO – óxido nítrico
G6PDH – glicose-6-fosfato desidrogenase	NOS – óxido nítrico sintase
GGT – γ -glutamyltranspeptidase	O₂^{•-} – ânion superóxido
Glu – glutamato	OH[•] – radical hidroxila
GPx – glutathiona peroxidase	PGO – privação de glicose e oxigênio
GR – glutathiona redutase	PKC – proteína cinase C
GSH – glutathiona reduzida	PSH – tióis protéicos
GSH-t – glutathiona total	SNC – sistema nervoso central
GSSG – glutathiona oxidada	SOD – superóxido dismutase
GST – glutathiona S-transferase	Zn²⁺ – zinco livre
H₂O₂ – peróxido de hidrogênio	ZnCl₂ – cloreto de zinco
KA – kainato	ZnT – transportadores de zinco
LDH – lactato desidrogenase	

RESUMO

A isquemia cerebral é uma redução transitória ou permanente do fluxo sanguíneo em uma determinada região do sistema nervoso central que leva a privação de glicose e oxigênio (PGO). Eventos como excitotoxicidade glutamatérgica e estresse oxidativo estão envolvidos no processo de isquemia e podem desencadear morte celular neuronal por apoptose ou necrose. O zinco, além de ser um elemento essencial para a estrutura e função de diversas proteínas, é liberado conjuntamente com o glutamato na transmissão sináptica glutamatérgica e pode exercer efeitos neuroprotetores ou neurotóxicos dependendo da sua concentração. A quercetina é um flavonóide adquirido através da alimentação com conhecidos efeitos neuroprotetores. O objetivo deste estudo foi desenvolver estratégias de neuroproteção utilizando fatias de hipocampo de ratos adultos submetidas a um modelo de isquemia e a um modelo de estresse oxidativo. O tratamento dos animais *in vivo* com ZnCl₂ (300 mg/L, p.o.) durante 30 dias não causou proteção em fatias de hipocampo de ratos submetidas ao modelo de isquemia *ex vivo*. Os testes de viabilidade e permeabilidade celular indicaram que a condição celular foi comprometida por 15 ou 60 minutos de isquemia. Os níveis de glutathiona total (GSH-t) foram reduzidos apenas após 2 horas de reperfusão. Os níveis de tióis protéicos (PSH) não foram alterados pela PGO. O ZnCl₂ teve um efeito dual nas fatias de hipocampo tratadas *in vitro*. Nas concentrações de 10 e 100 µM, o ZnCl₂ teve uma tendência a neuroproteção das fatias de hipocampo submetidas a 15 minutos de PGO com 2 horas de reperfusão. Entretanto, ZnCl₂ 100 µM demonstrou neurotoxicidade quando estas fatias foram expostas a 60 minutos de PGO seguido ou não por 2 horas de reperfusão. Na avaliação da permeabilidade celular, o ZnCl₂ 100 µM demonstrou tendência à neuroproteção no período de reperfusão tanto após 15 quanto 60 minutos de PGO. Ainda neste tratamento houve diminuição do conteúdo de PSH e GSH-t no período de 15 e 60 minutos de PGO especialmente nas concentrações mais elevadas (10 e/ou 100 µM). Quando fatias de hipocampo foram expostas por 1 ou 3 horas, o ZnCl₂ foi capaz de inibir a atividade da enzima antioxidante glutathiona redutase (GR), de forma similar à carmustina ou BCNU (inibidor específico desta enzima), não alterando a atividade das outras enzimas avaliadas. A inibição da GR pelo BCNU, não alterou a resposta isquêmica, indicando que a inibição da GR não é um fator determinante na toxicidade isquêmica. No tratamento *in vitro* com quercetina evidenciou-se neuroproteção na viabilidade celular nas concentrações de 10 e 30 µM, durante o período de isquemia, e na concentração de 10 µM no período de reperfusão. A neuroproteção também foi evidenciada na permeabilidade celular na concentração de 10 µM no período isquêmico e nas concentrações de 3, 10 e 30 µM na reperfusão. A quercetina, em todas as concentrações testadas, não reverteu a diminuição do conteúdo de GSH-t como também não alterou o conteúdo de PSH. A quercetina, nas concentrações de 30 e 100 µM, apresentou tendência neuroprotetora no teste de viabilidade celular quando fatias de hipocampo de ratos foram expostas ao H₂O₂ 2.5 mM, mas não foi capaz de reverter a redução do conteúdo de GSH-t quando expostas ao H₂O₂ 1.0 e 2.5 mM. O conteúdo de PSH não sofreu alteração quando H₂O₂ foi empregado. Estes resultados, então, sugerem que o ZnCl₂ não oferece neuroproteção quando administrado *in vivo*, enquanto que na administração *in vitro* apresentou um papel dual, ora neurotóxico, ora neuroprotetor. A inibição da enzima GR pelo ZnCl₂ não é um fator relevante para a sensibilidade à isquemia no modelo testado. A quercetina demonstrou uma forte ação neuroprotetora no modelo de isquemia *in vitro* e um moderado efeito neuroprotetor contra o H₂O₂.

ABSTRACT

Cerebral ischemia is characterized by a transitory or a permanent reduction in the blood flow in a specific area of the central nervous system, producing glucose and oxygen deprivation (OGD) to cells. Events such as glutamatergic excitotoxicity and oxidative stress can lead to necrotic or apoptotic neuronal cell death. Besides being an essential element in the structure and function of a number of proteins, Zinc is released concurrently with glutamate in the glutamatergic synaptic transmission, exerting a modulatory role. Quercetin is a flavonoid obtained through the food, displaying known neuroprotective effects. The objective of this study was to develop neuroprotection strategies utilizing a model of ischemia and a model of oxidative stress by using hippocampal slices of adult rats. The animals treated *in vivo* with ZnCl₂ (300 mg/L; p.o.) during 30 days did not show any evidence of neuroprotection in the hippocampal slices in the *ex vivo* ischemia model. The cell viability and permeability tests indicated impairment in the cell condition after 15 or 60 min of ischemia. The total glutathione (GSH-t) levels were decreased only after 2 hours of reperfusion. Protein thiol (PSH) content remained unchanged in all treatment conditions. In the *in vitro* treatment with ZnCl₂ the response was dual, when the cell viability was evaluated, ZnCl₂ 10 and 100 μ M was able to protect hippocampal slices exposed to 15 minutes OGD followed by 2 hours of reperfusion, however, ZnCl₂ 100 μ M was neurotoxic when these slices were subjected to 60 minutes of OGD followed, or not, by 2 hours of reperfusion. In the cell permeability assay, ZnCl₂ 100 μ M was neuroprotective in the reperfusion period. Still, GSH-t and PSH content decreased after 15 or 60 min PGO specially at the highest ZnCl₂ (10 and/or 100 μ M) tested concentration. In hippocampal slices incubated for 1 or 3 hours, ZnCl₂ was able to inhibit the activity of the antioxidant enzyme glutathione reductase (GR), as did the GR specific inhibitor carmustine (BCNU). The GR inhibition by BCNU did not alter the ischemic response, indicating that GR inhibition is a secondary event in the toxicity induced by the ischemic insult, which is in accordance with published data. In the *in vitro* treatment using quercetin it was possible to unravel neuroprotection at quercetin 10 and 30 μ M when the cell viability was tested during the ischemic or in the reperfusion period. Quercetin at different concentration was unable to reverse the GSH-t content decrease in the 2-hours reperfusion period. The PSH levels remained unchanged in all treatments. Quercetin at 30 and 100 μ M produced neuroprotection in the cell viability test when the hippocampal slices were exposed to 2.5 mM H₂O₂, but was unable to reverse the GSH-t decrease when hippocampal slices were exposed to 1.0 or 2.5 mM H₂O₂. The PSH content remained unaltered after H₂O₂ treatment. These results suggest that ZnCl₂ did not cause neuroprotection when administered *in vivo*, while, *in vitro* it caused a dual effect, being neurotoxic or neuroprotective, depending on the parameter tested. Inhibition of GR is not a relevant factor in the ischemic model employed. Quercetin, demonstrated a strong neuroprotective action in the *in vitro* ischemia model and a moderate neuroprotective effect against H₂O₂.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Metabolismo Oxidativo

1.1.1. Espécies Reativas de Oxigênio e Estresse Oxidativo

Espécies reativas de oxigênio (ERO) são moléculas contendo oxigênio, formadas a partir de radicais livres durante o metabolismo normal e/ou quando o organismo é exposto a vários estímulos, como radiação ionizante ou biotransformação de xenobióticos. Radicais livres são átomos ou moléculas altamente reativos que possuem elétrons não-emparelhados em sua última camada (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Em situações fisiológicas, a formação de radicais livres ocorre normalmente no organismo de seres aeróbicos, especialmente durante a respiração. Na mitocôndria, em torno de 1 a 2% do O_2 participa de reações monoeletrônicas, escapando da redução tetravalente do O_2 pela aceitação de quatro elétrons para sua neutralização, resultando na formação de H_2O . Dentre as ERO existem as radicalares, como o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e o radical hidroxila (OH^\bullet), e as não-radicalares, derivadas diretamente do oxigênio como o peróxido de hidrógeno (H_2O_2) e o oxigênio singlet ($O_2^1\Sigma g^+$). O aumento da formação dessas ERO pode levar à condição de estresse oxidativo (Sies, 1997; Shaw, 1998; Halliwell e Gutteridge, 2007).

O estresse oxidativo pode resultar da geração excessiva de ERO; da diminuição da capacidade antioxidante natural do organismo ou ainda da combinação desses fatores (Sies, 1997). Vários fatores podem contribuir para o estabelecimento do estresse oxidativo, como por exemplo, a liberação de metais de transição ou mesmo metais sem ação redox direta, como o Zn^{2+} (Maret, 1998). Esse desequilíbrio pró-oxidante leva a danos para as células, tais como danos nas membranas de diversas organelas celulares

(mitocôndria, retículo endoplasmático, membrana plasmática) (Hayashi *et al.*, 2003; 2005). A lipoperoxidação pode provocar uma desregulação na homeostase iônica, como por exemplo, através do aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular. Além disto, lesões oxidativas ao DNA tendem a aumentar pelo ataque direto de ERO. Esta situação se torna ainda pior se os mecanismos de reparo ficam comprometidos (Trotti *et al.*, 1998; Martindale e Holbrook, 2002; Lee *et al.* 2002a).

O aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} , decorrente de condições excitotóxicas leva à ativação de enzimas como a óxido nítrico sintase (NOS), fosfolipase A_2 e xantina oxidase, elevando a produção de ERO (Davis *et al.*, 2001). O óxido nítrico (NO) produzido pela NOS interage com o $\text{O}_2^{\bullet-}$ para produzir peróxinitrito (ONOO^-), sendo esta uma espécie altamente reativa que, entre outros, oxida proteínas que contêm grupos tióis (White *et al.*, 2000). Nesta condição ocorre uma produção elevada de ácido araquidônico, em consequência da elevada atividade da fosfolipase C e A_2 , ativadas pela despolarização, levando à formação de elevadas concentrações de ácidos graxos livres, estes por sua vez são deletérios à sobrevivência neuronal (Zhang *et al.*, 2003; Fachinetti *et al.*, 1998).

Além disto, ao oxidar grupos tióis, as ERO inibem a remoção do glutamato extracelular pelo comprometimento da capacidade máxima de seus transportadores de alta afinidade (Miralles *et al.*, 2001).

1.1.2. Defesas Antioxidantes

As células possuem numerosas defesas antioxidantes que definidas por Halliwell e Gutteridge (2007) são “quaisquer substâncias que retardam, previnem ou removem danos oxidativos à uma molécula-alvo”. Essas defesas podem ser constituídas por

sistemas enzimáticos através de enzimas como superóxido dismutase, a catalase, e a glutathione peroxidase; ou ainda por sistemas não-enzimáticos como a glutathione, as vitaminas A, C, E e β -caroteno (Martindale e Holbrook, 2002).

Dentre os compostos de defesa não-enzimáticos a glutathione (GSH) é um dos mais importantes antioxidantes, sendo o tiol não protéico mais abundante nas células de mamíferos, com uma concentração variando de 1-10 mM. No sistema nervoso central (SNC) a GSH tem uma concentração próxima de 2 mM (Dringen *et al.*, 2000).

A glutathione é formada por três diferentes aminoácidos: o glutamato, a cisteína e a glicina formando o tripeptídeo γ -L-glutamyl-L-cysteinyl-glicina. Ela reage diretamente com as ERO, sendo utilizada pela enzima antioxidante glutathione peroxidase (GPx) para reduzir hidroperóxidos (Figura 1). A ação da GPx leva a oxidação da GSH, formando o dissulfeto da glutathione, sua forma oxidada (GSSG) e também a formação de água. A GSSG é reduzida para GSH pela enzima glutathione reductase (GR) requerendo nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH) como cofator (Figura 1). A glutathione, além de ser cofator para várias enzimas, funciona como um tampão redox intracelular, importante para sobrevivência neuronal (Bains e Shaw, 1997; Dringen *et al.*, 2000).

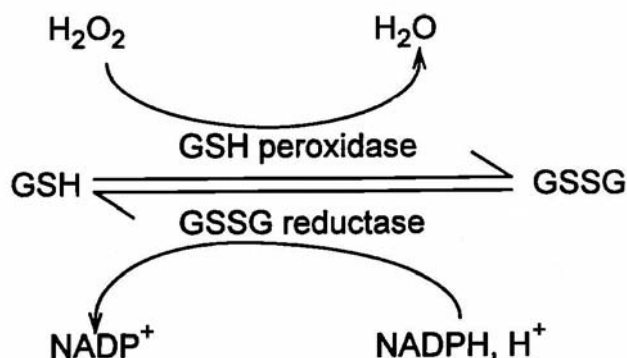


Figura 1: Ciclo redox da Glutathione. A glutathione (GSH) é utilizada pela enzima glutathione peroxidase (GPx) para reduzir peróxidos de hidrogênio (H_2O_2) formando água (H_2O) e glutathione oxidada (GSSG). Esta por sua vez, é reduzida em GSH através da enzima glutathione reductase (GR) utilizando nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH) como cofator, gerando, assim, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP^+) (Retirado de Shaw, 1998).

No meio intracelular a GSH é sintetizada a partir da ação de duas enzimas que utilizam ATP para sua reação, a γ -glutamil-cisteína ligase (GCL), que usa o glutamato e cisteína como substratos, formando o dipeptídeo γ -GluCys (Figura 2). Este é posteriormente combinado com a glicina em uma reação catalisada pela enzima glutathione sintetase (Dringen *et al.*, 2000).

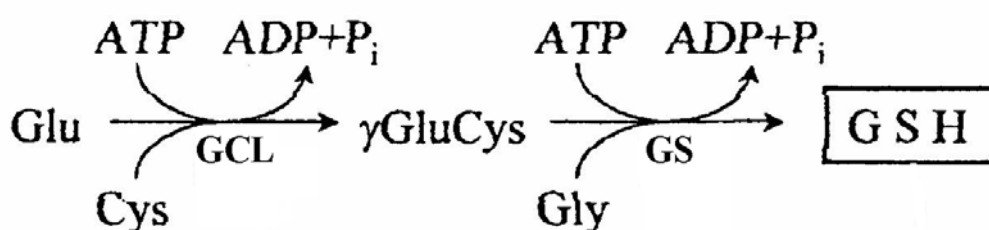


Figura 2: Síntese da Glutathione. A glutathione (GSH) é sintetizada a partir de três aminoácidos, a enzima γ -glutamil-cisteína ligase (GCL) promove a ligação entre os aminoácidos glutamato (Glu) e a cisteína (Cys) através da utilização de adenosina-5'-trifosfato (ATP) formando o dipeptídeo γ -glutamilcisteína (γ GluCys) que na sequência é combinado ao terceiro aminoácido glicina (Gly) pela enzima glutathione sintetase (GS) também utilizando ATP para sua reação (Adaptado de Dringen *et al.*, 2000).

A síntese de GSH inicialmente é dada nos astrócitos, pois os neurônios não são capazes de usar a cistina, um precursor da cisteína, para tal síntese (Griffin *et al*, 2005).

Quando a GSH é liberada pelos astrócitos para o espaço extracelular é rapidamente convertida através de uma ectoenzima presente na membrana plasmática chamada γ -glutamyltranspeptidase (GGT). A GGT transfere a porção γ -Glu para outro aminoácido/peptídeo acceptor formando o derivado γ -glutamyl-acceptor, e liberando o dipeptídeo cisteinilglicina (CysGly) (Dringen *et al.*, 1999). O CysGly é degradado por ectopeptidases na membrana plasmática neuronal, liberando os aminoácidos cisteína e glicina, sendo estes os substratos necessários para a síntese da GSH neuronal. Desta forma, há a necessidade de uma interação entre astrócitos e neurônios para que os neurônios possam manter a síntese de GSH (Wang e Cynader, 2000; Pastore, 2003).

Tão necessárias quanto à GSH, as enzimas antioxidantes possuem um papel fundamental na defesa contra as ERO, pois é através da superóxido dismutase (SOD) que cataliza a dismutação do $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 , da catalase (CAT) e da glutathione peroxidase (GPx) que removem o H_2O_2 do meio, que a célula evita a formação da espécie altamente reativa como OH^{\bullet} (Dringen *et al.*, 2000). Segundo Chan (1996), no cérebro existe uma quantidade reduzida de catalase, sendo que a GPx é a maior responsável, então, pela remoção dos H_2O_2 , utilizando doadores de elétrons para reduzi-lo à água devido a sua atividade peroxidase, como já mencionado através da utilização da GSH (Figura 1).

Existem ainda outras enzimas antioxidantes importantes como a glutathione redutase (GR) e γ -glutamyl transpeptidase (GGT) descritas acima (Figuras 1 e 2), além da glutathione S-transferase (GST) que conjuga agentes eletrofílicos com o grupo $-SH$ da GSH, tornando-os mais hidrofílicos e mais fáceis de serem metabolizados e excretados (Kehrer, 1983), e ainda a glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) que catalisa a

oxidação da glicose-6-fosfato a 6-fosfogliconolactona, hidrolisada em 6-fosfogliconato no ciclo das pentoses, gerando NADPH necessário para diversos processos de biosíntese (Voet *et al.*, 2000).

1.2. Isquemia Cerebral

A isquemia cerebral é uma redução transitória ou permanente do fluxo sanguíneo em uma determinada região do SNC. Esta redução pode ser decorrente de uma parada cardiorrespiratória ou uma obstrução parcial ou total do fluxo sanguíneo cerebral pela presença de material orgânico (trombos), ou até mesmo pelo enrijecimento das paredes dos vasos (arteriosclerose) que acarretam em diminuição do aporte sanguíneo e consequentemente levando a privação de glicose e oxigênio às células. A região acometida pela isquemia tem áreas denominadas de núcleo e penumbra. As células localizadas no núcleo são extremamente vulneráveis podendo morrer dentro de minutos, enquanto que a região da penumbra que circunda o núcleo é maior, possui células ainda viáveis por um período limitado de tempo e sofre processos fisiopatológicos que podem determinar a morte ou sobrevida dessas células (Leker e Shohami, 2002).

Acometidas por uma combinação de hipóxia e hipoglicemia, as células neuronais sofrem diversos eventos, como a liberação excessiva de aminoácidos excitatórios, aumento do Ca^{2+} intracelular, aumento da produção de ERO que, entre outros, podem desencadear a sua morte (White *et al.*, 2000).

A excitotoxicidade glutamatérgica ocorre quando as concentrações de glutamato (Glu), o principal neurotransmissor excitatório em vertebrados, se elevam no fluido extracelular. Quando liberado de modo descontrolado, pode se tornar uma potente toxina para neurônios e astrócitos (Chen *et al.*, 2000; Danbolt, 2001).

A excitotoxicidade (Figura 3) pode ocorrer por aumento da liberação de Glu e/ou pela diminuição de sua recaptação pelos transportadores de Glu de alta afinidade, como o EAAT3 (EAAC1 em ratos), que é preferencialmente expresso na membrana neuronal pós-sináptica. Além deste, o EAAT1 e EAAT2 (GLAST e GLT-1 em ratos) são expressos em astrócitos, enquanto que o EAAT4 é expresso no cerebelo e o EAAT5 na retina (Nieoullon *et al.*, 2006). Estes transportadores fazem o transporte de uma molécula de Glu acoplada ao co-transporte de três íons Na^+ e um H^+ , em contra-transporte a um íon K^+ (Meldrum, 2000). Em situações isquêmicas pode ocorrer uma diminuição da captação ou uma reversão do transporte neuronal de Glu pela insuficiente energia livre armazenada na forma de gradientes eletroquímicos transmembrana. Nestes casos, ocorre a liberação de Glu por esses transportadores contribuindo para o aumento extracelular de Glu a níveis excitotóxicos (Trotti, *et al.*, 1998; Katsumori *et al.*, 1999; Phillis *et al.*, 2000; Kanai *et al.*, 2003; Yeh *et al.*, 2005).

O aumento da liberação de Glu estimula excessivamente seus receptores de alta afinidade localizados na membrana neuronal pós-sináptica. Estes podem ser classificados de acordo com o tipo de receptor e sua afinidade por ligantes específicos, como os receptores ionotrópicos glutamatérgicos: o receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) que ativam canais de cálcio (Ca^{2+}), o receptor sensível ao ácido alfa-amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazolepropionico (AMPA) e o receptor cainato (KA) que levam ao influxo de Ca^{2+} , sódio e água para o interior das células. A excessiva ativação destes receptores acoplados a canais iônicos, especialmente na região lesionada, pode acarretar em formação de edema citotóxico e uma interrupção da homeostasia iônica (Meldrum, 2000; Molz *et al.*, 2008; Ni *et al.*, 2007).

A ativação dos receptores AMPA e dos receptores sensíveis ao aspartato (outro aminoácido excitatório presente no SNC) causa despolarização de membranas, inclusive

da membrana mitocondrial, resultando em aumento da permeabilidade e rápida redução da carga energética (Ahmad *et al.*, 2005; Schild e Reiser, 2005; Larsen *et al.*, 2006).

Devido a essa despolarização generalizada, canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem e os canais de Ca^{2+} regulados por glutamato, permitem o influxo do Ca^{2+} extracelular, que é acompanhado também por liberação de Ca^{2+} do retículo endoplasmático. O aumento dos níveis de Ca^{2+} intracelular ativam várias enzimas, tais como lipases, proteases e endonucleases, além de acentuar o estado pró-oxidativo celular (White *et al.*, 2000; Leker e Shohami, 2002).

A excitotoxicidade glutamatérgica associada ao estresse oxidativo, como observado no estudo realizado por Tan *et al.* (1998), faz com que as células sofram alterações encontradas em situações de apoptose e de necrose. Estas alterações são causadas por fatores internos e externos (Mattson, 2000).

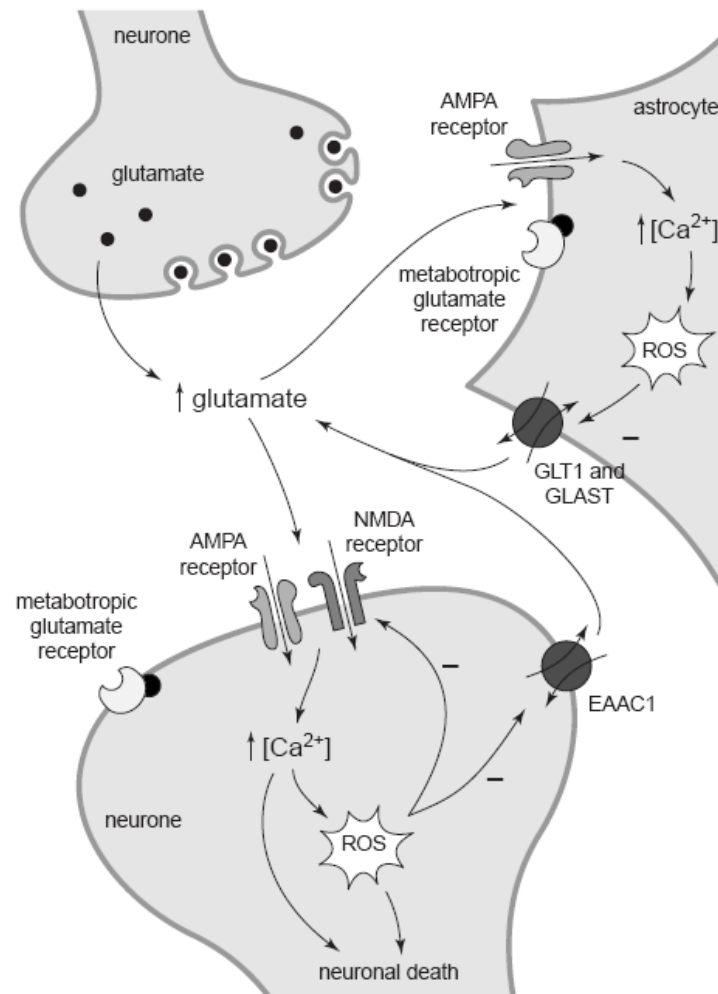


Figura 3: Excitotoxicidade. O aumento do Glu extracelular pode ser evocado pela excessiva liberação do Glu de neurônios pré-sinápticos e/ou pela diminuição da recaptação por seus transportadores (EAAC1, GLT1 e GLAST). Quando em excesso na fenda sináptica, pode estimular excessivamente seus receptores nos neurônios pós-sinápticos e em astrócitos (AMPA, NMDA) levando ao aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} nessas células, contribuindo para a produção de ERO e conseqüentemente por via direta e indireta levando à morte neuronal. As ERO podem também via ativação de enzimas influenciarem no transporte de receptores e transportadores de Glu (Retirada de Trotti *et al.*, 1998).

Vários estudos com diferentes modelos experimentais de isquemia cerebral têm sido realizados para estudar os mecanismos envolvidos na injúria isquêmica e também devido à necessidade de estabelecer estratégias terapêuticas em pacientes com doenças cerebrovasculares. A relevância desses modelos experimentais depende de sua replicabilidade e de sua importância clínica. Modelos de isquemia com a interrupção do fluxo sanguíneo completo ou incompleto, transitório ou permanente, focal ou global, de forma aguda ou crônica têm tentado aproximar ao máximo de situações clínicas (Hossmann, 2008).

Segundo Hossmann (2008), os modelos de isquemias mais encontrados são:

- globais: a) através de parada cardíaca por solução de cloreto de potássio ou outras soluções cardioplégicas que posteriormente levam a cessação do fluxo sanguíneo cerebral, mas que são mais complexas e de difícil reversão para restaurar a circulação; b) através da ligação de vasos específicos como as artérias vertebrais ou de grandes artérias como as carótidas comuns podendo ser ocluídas conjuntamente ou individualmente. Estas podem ser ocluídas por períodos determinados de tempo, permitindo assim a recirculação ou reperfusão, ou ainda permanentemente; c) através da diminuição da pressão sanguínea arterial por alterar seu sistema autoregulatório, aumentar a pressão intracraniana, promover estenose das artérias carótidas, produzir constrição das artérias subclávias ou formar fistulas artério-venosas promovendo assim uma isquemia incompleta; e também d) através da isquemia *in vitro* e ressucitação *ex vivo* em culturas primárias de neurônios, culturas organotípicas, ou por fatias de tecidos cerebrais que são incubadas em meio desprovidos de glicose e oxigênio. A isquemia *in vitro* imita situações *in vivo* com as vantagens de permitir o tratamento com diferentes substâncias, investigar as vias moleculares de injúria decorrente de processos isquêmicos, como também por permitir a reperfusão após a isquemia.

- focais: a) através da oclusão de artérias como a cerebral média, anterior e posterior, que interrompe o fluxo de sangue para regiões específicas onde essas artérias irrigam; b) pela introdução de material autólogo como coágulos sanguíneos na artéria que irriga a região que se quer estudar;

- oclusão microvascular: através de oclusão fototrombótica para produzir lesão isquêmica de tamanho e localização definidas. A produção de trombos é feita através da injeção intravenosa do corante “rose bengal” seguido pela exposição de iluminação a laser. Este tratamento produz uma coagulação microvascular na região do tecido exposto;

- microembolização: que se assemelha a ataques transitórios isquêmicos através da formação de agregados plaquetários pela injeção de ADP, araquidonato ou indução fototrombótica;

- infarto espontâneo: realizado em ratos com predisposição a acidentes vasculares por serem previamente hipertensos devido a uma dieta rica em sal;

- por fim outro modelo menos utilizado seria através de oclusão venosa, mas também é menos investigada.

1.3. Estratégias Neuroprotetoras

1.3.1. Zinco

O zinco (Zn^{2+}) é o micronutriente essencial mais abundante no organismo depois do ferro e um dos metais de transição que compõem diversas enzimas e proteínas. O cérebro possui uma maior quantidade de Zn^{2+} quando comparado a outros órgãos em uma proporção de dez vezes mais, sendo a sua concentração aproximadamente 150

$\mu\text{mol/L}$ (cerca de 100-150 μM). Já a concentração de Zn^{2+} no citosol neuronal é na ordem de nanomolar, e em níveis extracelulares pode chegar a níveis bem maiores, 500 nM (Sandstead *et al.*, 2000; Mocchegiani *et al.*, 2005).

No SNC, o Zn^{2+} pode ser encontrado em sua forma livre ou ligado a metaloenzimas ou a algumas proteínas como metalotioneínas tendo importância funcional e estrutural. Quando encontrado em baixas concentrações, o Zn^{2+} contribui para diversos processos biológicos como na atividade de fatores de transcrição gênica, síntese e reparo de RNA e DNA, catálise enzimática, e até mesmo na sinalização celular e neurotransmissão. Em condições fisiológicas o Zn^{2+} ainda interage com átomos eletronegativos, como o enxofre, nitrogênio e oxigênio mantendo-se seqüestrado em macromoléculas. O Zn^{2+} não possui atividade redox *per se*, consequentemente não produz radicais livres diretamente. Entretanto, quando liberado, especialmente de grupamentos tiólicos como da metalotioneína, pode promover a formação de ERO e tornar-se, então, bastante tóxico (Choi e Koh, 1998; Frederickson *et al.*, 2005).

Da mesma maneira, a deficiência de Zn^{2+} causa algumas anormalidades na pele e cabelo, distúrbios no crescimento, na função imune, na maturidade sexual, na cicatrização de ferimentos e também em funções neurológicas como anorexia, distúrbios emocionais, cognitivos e de coordenação e ainda distúrbios no olfato e paladar (Choi e Koh, 1998; Sandstead *et al.*, 2000).

O transporte de Zn^{2+} para o SNC (Figura 4) se dá através da barreira hemato-encefálica e hemato-fluido cérebroespinal ligado à albumina ou a um aminoácido como a histidina e a cisteína. No cérebro o maior conteúdo de Zn^{2+} encontra-se ligado a metalotioneínas ou armazenado em vesículas sinápticas presentes nos neurônios pré-sinápticos, em concentrações maiores de 1 mmol/L (Mocchegiani *et al.*, 2005).

Existem neurônios específicos que liberam Zn^{2+} conjuntamente com glutamato, os quais são denominados neurônios *gluzinérgicos*. Esses neurônios contribuem com quase metade de todas as sinapses glutamatérgicas. Seus corpos celulares se localizam mais pronunciadamente no córtex cerebral, amígdala e hipocampo, sendo que neste último há uma maior concentração de Zn^{2+} nas células granulares das fibras musgosas nas áreas do giro denteado, CA1 e CA3 (Frederickson *et al.*, 2000; Mocchegiani *et al.*, 2005).

O Zn^{2+} presente no soma dos neurônios *gluzinérgicos* é transportado para o terminal pré-sináptico através das vesículas pré-sinápticas associado ao glutamato. O Zn^{2+} entra nessas vesículas via proteínas transportadoras de Zn^{2+} chamadas de ZnT-3. Existem também transportadores de Zn^{2+} já encontrados nas membranas celulares, como o ZnT-1 e o ZnT-4, responsáveis pelo efluxo de Zn^{2+} quando em excesso no interior da célula. O transportador ZnT-7 regula a concentração de Zn^{2+} do citoplasma para aparelho de Golgi, e ainda o ZnT-2, o ZnT-5 e o ZnT-6 que estão em menor quantidade no cérebro e suas funções ainda não estão firmemente estabelecidas. Então, o Zn^{2+} nos terminais pré-sinápticos é liberado das vesículas através de exocitose dependente de impulso e de Ca^{2+} , permitindo a liberação de Zn^{2+} e Glu para a fenda sináptica. No neurônio pós-sináptico estes dois neurotransmissores podem atuar no mesmo receptor, como o receptor glutamatérgico NMDA e canais de AMPA/KA permeáveis a Ca^{2+} . O Zn^{2+} pode ainda entrar na célula através de canais de Ca^{2+} dependente de voltagem, transportadores do próprio Zn^{2+} e, ainda por trocadores de Na^+ - Ca^{2+} . Uma vez dentro dessas células o Zn^{2+} pode ser rapidamente sequestrado por metalotioneínas que regulam a disponibilidade de Zn^{2+} livre (Colvin *et al.*, 2000; Frederickson *et al.*, 2005; Mocchegiani *et al.*, 2005).

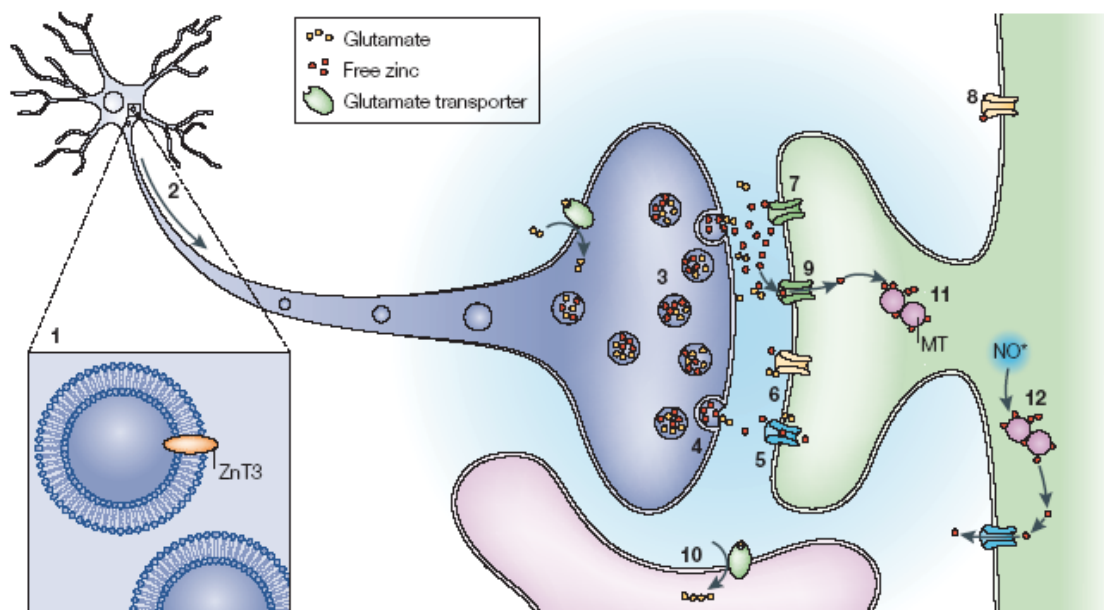


Figura 4: Transporte de Zn^{2+} nas células do SNC. (1) O Zn^{2+} é transportado para o interior das vesículas pré-sinápticas por proteínas transportadoras, ZnT3, e (2) através destas transportado do corpo celular neuronal para o botão terminal pré-sináptico. (3) Essas vesículas transportam Zn^{2+} conjuntamente com Glu em neurônios denominados gluzinérgicos, e quando já presentes no terminal pré-sináptico (4) são liberados por exocitose dependente de Ca^{2+} e impulso nervoso. (5-10) Na fenda sináptica o Zn^{2+} pode modular uma variedade de canais de transportadores e receptores em células neuronais e gliais. (9) Os canais de Ca^{2+} possuem permeabilidade ao Zn^{2+} permitindo sua entrada em neurônios pós-sinápticos, onde (11) pode ser sequestrado por metalotioneínas presentes no citosol. (12) Quando as metalotioneínas sofrem oxidação ou nitrosilação (NO) podem levar à liberação do Zn^{2+} para o meio intracelular ou também de volta a fenda sináptica por transportadores (Retirado de Frederickson *et al.*, 2005).

1.3.1.1. Papel Fisiológico do Zn^{2+} no SNC

A liberação do Zn^{2+} associado ao Glu tem diferentes atuações sobre os receptores de Glu: nos receptores NMDA tem ação inibitória por dois mecanismos que atuam em subunidades distintas da subunidade do Mg^{+2} : um sítio voltagem-dependente na subunidade NR2B onde a corrente iônica é deprimida por baixas concentrações de Zn^{2+} (10-100 μM) bloqueando o canal, e outro sítio voltagem-independente na subunidade

NR2A que diminui a probabilidade de abertura do canal; nos receptores AMPA/KA o Zn^{2+} potencializa sua resposta em relação ao NMDA modulando a característica da resposta excitatória. O Zn^{2+} ainda pode modular a liberação do ácido γ -aminobutírico (GABA) de neurônios GABAérgicos, bloqueando suas respostas. O Zn^{2+} atua também em receptores de glicina de neurônios glicinérgicos, inibindo sua neurotransmissão, mas ainda, neste último, há necessidade de maiores estudos. Devido a estas características pode se dizer que o Zn^{2+} tem um papel na modulação da excitabilidade do SNC interagindo com o glutamato, e provavelmente com o GABA, demonstrando também a sua importância na plasticidade sináptica (Colvin *et al.*, 2000; Frederickson *et al.*, 2000; Frederickson *et al.*, 2005).

Tem sido proposto também que o Zn^{2+} pode interagir com receptores metabotrópicos glutamatérgicos (mGLUR), inibindo a liberação de Ca^{2+} promovida pelo 1,4,5-inositol trifosfato (IP3), e ainda bloqueando, ou ao menos alterando a velocidade de condução de vários canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (Mocchegiani *et al.*, 2005). Pesquisas futuras apontam ainda que o Zn^{2+} tem um efeito potencial sobre receptores aminérgicos, purinérgicos e colinérgicos, mas que requerem maior fundamentação (Frederickson *et al.*, 2005).

1.3.1.2. Mobilização intracelular de Zn^{2+}

O conteúdo de Zn^{2+} existente nos neurônios pós-sinápticos não é apenas proveniente dos terminais pré-sinápticos, mas também de metalotioneínas presentes no citosol desses neurônios. Metalotioneínas são pequenas proteínas que ligam íons de metais pesados como o cádmio, mercúrio ou Zn^{2+} . As tioneínas possuem diversos resíduos de cisteína podendo ligar até sete átomos de Zn^{2+} em cada uma das

subunidades, demonstrando sua importante função na manutenção da homeostasia intracelular de Zn^{2+} , prevenindo o seu aumento excessivo por rapidamente seqüestrá-lo, logo após a captação. Em situação fisiológica as metalotioneínas estão em equilíbrio com as tioneínas não-metaladas (Mocchegiani *et al.*, 2005).

1.3.1.3. Zn^{2+} na isquemia

Durante a isquemia (Figura 5), o Zn^{2+} liberado pelos terminais pré-sinápticos glutamatérgicos levam a translocação e ao aumento de seu conteúdo nos neurônios pós-sinápticos por aumentar a sensibilidade dos canais AMPA/KA permeáveis a Ca^{2+} e ao Zn^{2+} , ou pelos receptores NMDA, além da facilidade de troca do Zn^{2+} - Na^{+} por seus trocadores. O aumento da sensibilidade destes canais pode ser evocado pelo aumento da expressão dos canais AMPA/KA permeáveis a Ca^{2+} por provocar uma dessensibilização da subunidade GluR2 e por promover um aumento na expressão dos transportadores de Zn^{2+} , em especial do ZnT1 (Liu *et al.*, 2004; Kwak e Weiss, 2006).

O excesso de Zn^{2+} intracelular pode também ser dado por oxidação de metalotioneínas diminuindo sua afinidade por Zn^{2+} e por interagir com dissulfetos, como àquele da glutathiona (GSSG). Após sua liberação, o Zn^{2+} pode ser transferido a fatores de transcrição, modulando a expressão de genes envolvidos na resposta antioxidante, e ainda, por nitrosilação dos resíduos de cisteína de metalotioneínas ligadas ao Zn^{2+} (principalmente das metalotioneínas - MT3 presentes no citosol pós-sináptico) promovendo a liberação dos íons Zn^{2+} para o citosol (Yanagitani *et al.*, 1999; Mocchegiani *et al.*, 2005).

Quando livre no citosol, o Zn^{2+} pode ativar vias de transdução de sinais através da PKC e ser transferido para enzimas pró-apoptóticas como óxido nítrico sintase (NOS) e endonucleases que promovem a produção de ERO. Estas por sua vez, associadas à

acidose do meio intracelular, também contribuem para a liberação de Zn^{2+} de metalotioneínas e de outras proteínas ligantes de Zn^{2+} (Wei *et al.*, 2004; Sensi *et al.*, 2006; Frazzini *et al.*, 2007). O Zn^{2+} aumenta a injúria neuronal induzida por Glu por inibir canais GABA_A e inibir a recaptção de Glu por seus transportadores (EAAT-1) em células gliais (Côté *et al.*, 2005).

Devido, então, a todos esses motivos o aumento do Zn^{2+} intracelular pode, potencialmente, induzir a disfunção mitocondrial. Isto pode levar ao aumento da produção de ERO e conseqüentemente ativar a via de apoptose pela liberação mitocondrial de fatores pró-apoptóticos, tais como o citocromo C ou ativação de caspases. O Zn^{2+} também pode atuar na via de necrose neuronal e nas respostas antioxidantes, contribuindo para o aparecimento de diversas doenças neurodegenerativas e por disfunções relacionadas ao envelhecimento (Kwak e Weiss, 2006; Galasso e Dyck, 2007).

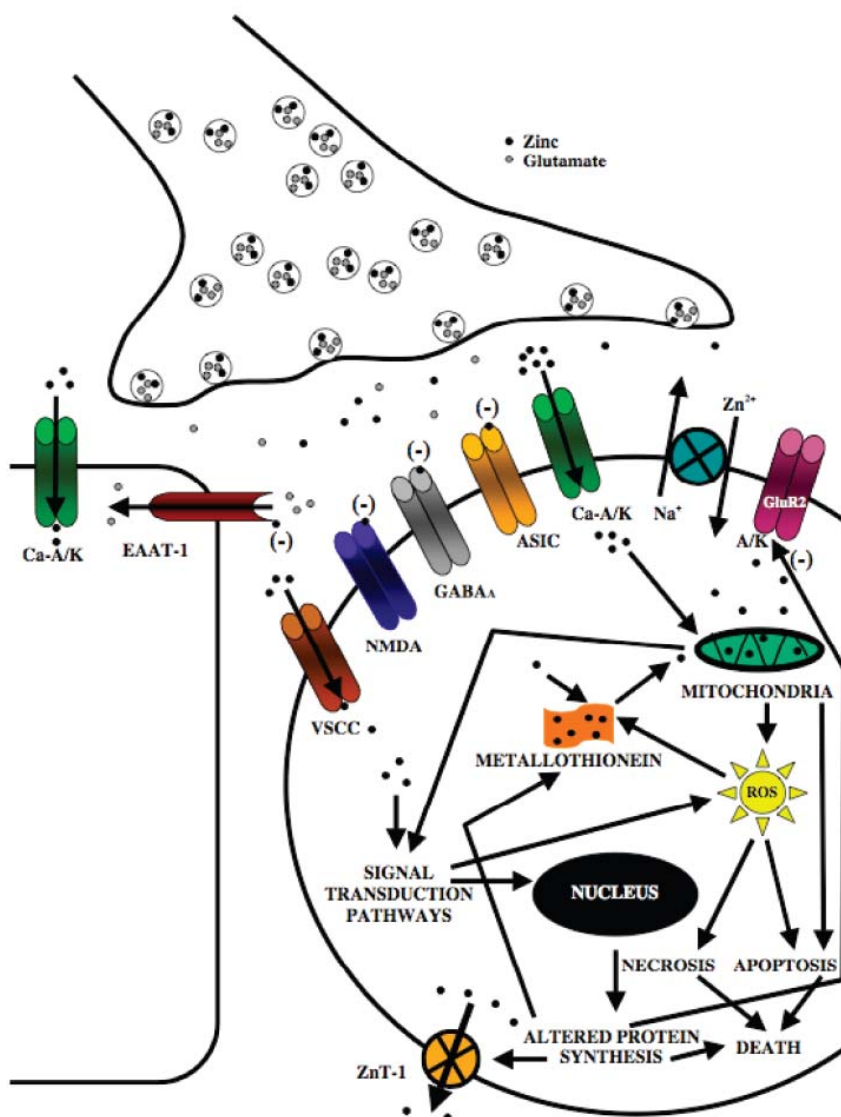


Figura 5: Zn^{2+} na isquemia. Durante a isquemia o Zn^{2+} liberado dos terminais pré-sinápticos glutamatérgicos pode entrar nas células pós-sinápticas através de canais AMPA/KA permeáveis a Ca^{2+} (Ca-A/K), por trocadores de Zn^{2+} - Na^{+} , em menor proporção, por canais de Ca^{2+} sensíveis a voltagem (VSCC) ou receptores NMDA. O excesso de Zn^{2+} intracelular pode promover disfunção mitocondrial e geração de ERO podendo levar à morte celular por necrose ou apoptose. O estresse oxidativo e acidose intracelular podem levar a liberação de Zn^{2+} ligado a metalotioneínas aumentando a concentração intracelular de Zn^{2+} , e também aumentando a regulação de transportadores de Zn^{2+} promovendo efluxo deste. A ativação de vias de transdução de sinais como pela PKC, também promovem a geração de ERO e podem agir diretamente no núcleo alterando a síntese de proteínas que, por sua vez, também contribui para morte celular. O Zn^{2+} pode também promover uma dessensibilização das subunidades GluR2 nos receptores AMPA/KA, inibir canais GABA_A e bloquear transportadores de Glu (EAAT-1) em astrócitos aumentando a injúria neuronal induzida por Glu, como também injúria glial. Por outro lado, o Zn^{2+} pode proteger células neuronais por inibir o influxo de Ca^{2+} bloqueando receptores NMDA ou canais de íons sensíveis a acidose (ASIC) ou exercendo efeitos anti-apoptóticos por inibir várias caspases, genes pró-apoptóticos e endonucleases (Retirado de Galasso e Dyck, 2007).

Por outro lado, de acordo com alguns estudos realizados nos últimos anos, parece que o Zn^{2+} pode exercer também efeito neuroprotetor por inibir o influxo de Ca^{2+} e Glu, podendo contribuir para proteção contra excitotoxicidade glutamatérgica decorrente de processos isquêmicos (Takeda *et al.*, 2003; 2006). Sua ação pode ser através do bloqueio dos receptores NMDA (Chen e Liao, 2003) ou sensibilizando canais iônicos, exercendo desta maneira, efeito anti-apoptótico inibindo várias caspases, genes pró-apoptóticos e endonucleases (Galasso e Dyck, 2007). Alguns estudos *in vivo* também demonstram um efeito neuroprotetor do Zn^{2+} contra efeitos tóxicos produzidos pelo inseticida malation, comumente utilizado na agricultura, diminuindo alterações neuroquímicas, morfológicas e comportamentais (Brocardo *et al.*, 2007), além de induzir a produção do fator neurotrófico BDNF e a ativação de vias de sinalização envolvidas na neuroproteção (Brocardo *et al.*, 2005; Franco *et al.*, 2008a).

Muito se têm discutido e pesquisado sobre o metabolismo e a ação do Zn^{2+} , mas ainda existem controvérsias sobre seu funcionamento em situações de envelhecimento, doenças neurodegenerativas, processos isquêmicos e traumas crânio-encefálicos. Os modelos de hipóxia/isquemia *in vitro*, com fatias de hipocampo submetidas à privação de glicose e oxigênio, imitam condições isquêmicas *in vivo*, podendo ser uma forma conveniente de abordar o tema em questão. Na isquemia cerebral pode se dizer, atualmente, que o Zn^{2+} exerce efeitos neuroprotetores assim como neurotóxicos e diante dessa contradição propõe-se, através deste estudo, investigar o papel do Zn^{2+} em uma situação de privação de glicose e oxigênio em um modelo de isquemia *in vitro*.

1.3.2 Flavonóides e quercetina

1.3.2.1. Flavonóides

Flavonóides são grupos de compostos polifenólicos que não podem ser sintetizados pelo metabolismo humano e, portanto são adquiridos através da alimentação. O termo flavonóide é derivado do latim *flavus* que significa amarelo, e recebeu este nome por ter sido encontrado originalmente em alimentos de coloração amarelada, mas atualmente já foi encontrado também em outros de colorações diversas. Eles são formados nas plantas pela combinação dos aminoácidos fenilalanina e tirosina com unidades acetato. Existem mais de 8.000 variedades de flavonóides, mas os seis grupos já classificados são: flavanonas, flavonas, flavonóis, isoflavonóides, antocianinas e flavans (Peterson e Dwyer, 1998; Cotelle, 2001).

Os alimentos onde podem ser encontrados os flavonóides são: frutas, legumes, vegetais, leite, açúcares, grãos como também em sucos de frutas, vinho tinto, chás de ervas, café e chocolate, sendo estes todos derivados de plantas (Peterson e Dwyer, 1998; Scalbert e Williamson, 2000; Aherne e O'Brien, 2002). A quercetina é um dos componentes do grupo flavonóis mais encontrados nesses alimentos, e facilmente absorvido por pequenas células intestinais onde sofrem hidrólise para posteriormente entrarem na corrente sanguínea e seus metabólitos não utilizáveis serem excretados pela urina (Murota e Terao, 2003; Manach *et al.*, 2005).

Muito se têm estudado sobre a ação dos flavonóides no metabolismo dos seres humanos, como sua ação na fisiopatologia de doenças agudas ou crônicas. No estudo randomizado realizado por Kenekt *et al.* (2002), foi investigado a ação dos flavonóides nas mais diversas doenças como doenças cardiovasculares, cerebrovasculares, câncer de pulmão e próstata, asma brônquica, diabetes tipo 2 e artrite reumatóide, com o

acompanhamento dos indivíduos por vários anos. Pode ser observado que os indivíduos que tiveram uma dieta rica em flavonóides obtiveram uma redução significativa das doenças apresentadas, inclusive uma redução da mortalidade na população estudada, sendo a quercetina o composto mais encontrado nos alimentos consumidos por tal população. Outros estudos também descrevem os flavonóides como protetores em diferentes situações como em insultos provocados por cloreto de potássio (De Ruvo *et al.*, 2000), mostrando, assim, propriedades antiinflamatórias, antiarrítmicas, antitumoral, antiviral e antineurodegenerativas (Prior, 2003; Kang *et al.*, 2005).

O efeito neuroprotetor dos flavonóides foi evidenciado em estudos como o de Mandel *et al.* (2005), onde catequinas originárias de chá verde protegeram as células neuronais de morte em modelos animais de doenças neurodegenerativas como pela toxicidade por MPTP (Doença de Parkinson), pelo peptídeo β -amilóide (Doença de Alzheimer), na isquemia cerebral unilateral ou global e ainda, em modelos de estresse oxidativo por peróxido de hidrogênio. Kang *et al.* (2005) descreve a ação neuroprotetora sobre a citotoxicidade provocada pelo peptídeo beta-amilóide na doença de Alzheimer, como também no estudo de Aruoma *et al.* (2003), que descreveram ação neuroprotetora sobre a demência observada nas infecções pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e nas doenças de Alzheimer e Parkinson.

Os flavonóides, ainda, protegem células neuronais do estresse oxidativo causado por outros tipos de insultos como do ácido homocisteico, privação de cistina, butionina sulfoximina, hipoglicemia, insultos isquêmicos e peróxido de hidrogênio que podem levar à morte celular induzida por glutamato. A ação neuroprotetora dos flavonóides pode ocorrer por três mecanismos diferentes: alteração do metabolismo da GSH, extinção de ERO, inibição do influxo de Ca^{2+} e manutenção dos níveis de ATP (Ishige *et al.*, 2001; Maher *et al.*, 2007).

1.3.2.2. Quercetina

O flavonóide quercetina (3,3',4',5,7-pentaidroxiflavona) (Figura 6) é um dos mais abundantes encontrados em frutas e vegetais, e também é um dos componentes mais conhecidos na *Ginkgo Biloba* e na erva de São João (*Hypericum perforatum*). Ele é formado por anéis catecóis que podem sofrer metabolização oxidativa até ser desmetilada, se conjugando com a glutathiona e formando o 2'-glutationil-quercetina, podendo exercer efeitos protetores ou tóxicos nas células (Prior, 2003; Willians *et al.*, 2004).

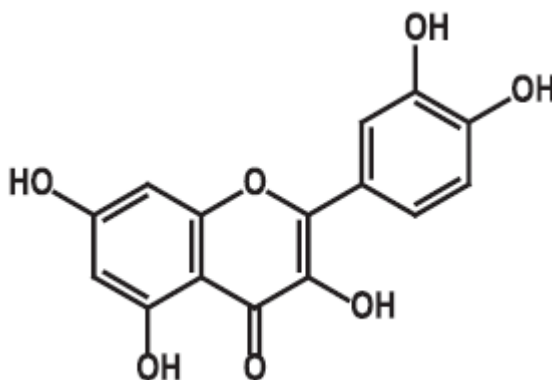


Figura 6: Estrutura do flavonóide quercetina. (Retirado de Willians *et al.*, 2004).

A quercetina é encontrada nos alimentos regularmente consumidos na dieta humana tendo sido motivo de vários estudos para entender sua ação. Pesquisas têm descrito várias propriedades da quercetina, tais como antitumorais, antitrombóticas, antiinflamatórias, antiapoptóticas e antioxidantes. Sua ação provavelmente envolve suas propriedades antioxidantes em muitas situações, incluindo a modulação do estado redox intracelular em diversos tipos de doenças, bem como também em situações de isquemia e reperfusão (Prior, 2003).

Estudos descrevem a ação da quercetina como um antioxidante agindo na redução da formação de ERO por inibir algumas enzimas ou quelando alguns elementos como metais envolvidos na produção de radicais livres, fazendo varredura das ERO, e ainda aumentando ou protegendo as defesas antioxidantes (Cotelle, 2001).

A ação antioxidante da quercetina pode ser explicada por sua participação em inibir enzimas como a ciclooxigenase, lipoxigenase e xantina oxidase que estão envolvidas na citotoxicidade oxidativa (Peterson e Dwyer, 1998).

Outra descrição da atividade antioxidante da quercetina, bem como de outros flavonóides, foi descrita por Ishige *et al.* (2001) onde uma linhagem específica de células (HT-22) deficientes em receptores glutamatérgicos ionotrópicos foram submetidas ao insulto por glutamato. Foi observado proteção na presença de quercetina e fisetina. Entre os possíveis mecanismos de ação encontram-se o aumento intracelular de GSH e diminuição dos níveis de ERRO, fatores importantes na prevenção do influxo de Ca^{2+} e da morte celular.

Estudos usando quercetina *in vivo* demonstraram que seus metabólitos exibiram atividade antioxidante, com redução na peroxidação lipídica e atuando no sistema de detoxificação através das defesas antioxidantes enzimáticas e não-enzimáticas no fígado (Prior, 2003). Outros estudos, também demonstraram a ação protetora da quercetina na isquemia/reperfusão hepática e renal com os mesmos efeitos antioxidantes (Singh *et al.*, 2004; Polat *et al.*, 2006).

Os flavonóides, dentre eles a quercetina, podem exercer também efeitos modulatórios sobre diferentes proteínas das cascatas de sinalização envolvidas na sobrevivência ou morte celular. Entre estes alvos, estão a fosfatidil inositol 3-cinase (PI3-K), proteína cinase B (PKB/Akt), tirosinas cinases, proteína cinase C (PKC) e MAP cinases (MAPK) (Kroon *et al.*, 2004; Willians *et al.*, 2004).

A ação da quercetina no SNC tem sido relatada em diferentes tipos de insultos. Um estudo realizado por Naidu *et al.* (2003) pôde demonstrar a ação protetora da quercetina em um tratamento crônico com neurolépticos (haloperidol), que produziu discinesia orofacial em ratos por atuar como antagonista de receptores dopaminérgicos (D2) aumentando a produção de radicais livres, peroxidação lipídica e diminuindo os níveis de GSH. Já Takizawa *et al.*, (2003) evidenciaram que a quercetina também pôde proteger contra danos no trato óptico de ratos sujeitos a um modelo de hipoperfusão cerebral.

Estudos, como o de Sarkar e Das (2006), a ação neuroprotetora da quercetina foi demonstrada. Este estudo utilizou um modelo de isquemia *in vivo* pela oclusão das artérias carótidas comuns por 30 min seguido de 30 min de reperfusão. Neste modelo a quercetina levou a uma diminuição do edema cerebral de ratos jovens e idosos com preservação da atividade das enzimas antioxidantes. Outro estudo demonstrou o efeito neuroprotetor da quercetina em insultos por privação de glicose e oxigênio, e na excitotoxicidade por NMDA e cainato. A quercetina também reduziu a injúria de células corticais causada por radicais livres em modelos que utilizam a administração de Zn^{2+} , ferro, inibidores da síntese de glutatona (BSO) e pelo uso de Nitroprussiato de sódio em cultura (Ha *et al.*, 2003). Metaloproteinases de matriz também mostraram que a quercetina tem ação direta sobre as mesmas, oferecendo neuroproteção através da diminuição do tamanho da área infartada ou da formação do edema em ratos jovens ou com idade avançada (Cho *et al.*, 2006). Além disso, através do estudo de Pu *et al.* (2007), foi observado que a ação neuroprotetora da quercetina e da rutina envolvendo a melhora em testes de memória espacial em ratos e a redução da morte neuronal. O modelo de isquemia repetida com a oclusão das artérias carótidas por 10 min, duas vezes em uma hora, foi utilizado neste caso.

A ação citoprotetora da quercetina também foi demonstrada em estudos com insultos por estresse oxidativo *in vitro* induzido, em células C6 de gliomas e macrófagos (Chow *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2006). A quercetina foi capaz de inibir a morte celular apoptótica, com diminuição da produção de ERO e da disfunção mitocondrial. Ação esta também descrita por Dajas *et al.* (2003) em cultura de células PC12 tratadas com H₂O₂ e isquemia. Mas outros estudos como o de Boots *et al.* (2007) descrevem que a quercetina pode trazer efeitos tóxicos em sua ação antioxidante. Este estudo utilizando linfócitos e outras células do plasma sanguíneos, observou que a quercetina, quando reage com H₂O₂ forma sub-produtos durante processos oxidativos, tais como semi-quinonas e quinonas. Estes foram denominados de “quercetina-quinona” pelos autores, sendo altamente reativos com tióis, como a GSH. Estas quinonas também podem se ligar a tióis de proteínas levando ao comprometimento da função de certas enzimas como a cálcio-ATPase do retículo endoplasmático ou sarcoplasmático, que é responsável pelo sequestro de cálcio. Em células pulmonares a quercetina levou ao dano no DNA, com redução dos níveis de GSH, liberação de LDH e aumento da concentração intracelular de cálcio.

Em suma, a quercetina tem inúmeras ações, entre elas: proteção contra a isquemia e reperfusão *in vivo* e em culturas de células, proteção contra a excitotoxicidade glutamatérgica, reequilíbrio da homeostasia iônica, principalmente contra a elevação do Ca²⁺ intracelular, além de apresentar propriedades antioxidantes. Por outro lado, a quercetina também pode acarretar em toxicidade, especialmente através da diminuição no conteúdo de GSH e do dano ao DNA. Diante deste paradoxo, a presente pesquisa também se propôs em investigar a ação da quercetina em fatias de hipocampo de ratos submetidas a um modelo de isquemia/reperfusão e a um modelo de estresse oxidativo, ambos *in vitro*.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

- Desenvolver estratégias de neuroproteção utilizando um modelo de isquemia e um modelo de estresse oxidativo *in vitro*, em fatias de hipocampo de ratos.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o possível efeito neuroprotetor do Zn^{2+} no tratamento de fatias de hipocampo de ratos submetidas à um modelo de isquemia *ex vivo* e *in vitro*.
- Avaliar o possível efeito neuroprotetor da quercetina em fatias de hipocampo de ratos submetidas ao modelo de isquemia e estresse oxidativo *in vitro*.
- Avaliar variáveis marcadoras de dano e/ou de proteção em fatias de hipocampo de ratos submetidas ao modelo de isquemia e estresse oxidativo *in vitro*:
 - a) viabilidade celular;
 - b) permeabilidade celular;
 - c) defesas antioxidantes não-enzimáticas (conteúdo de glutathione total e tióis protéicos);
 - d) atividade de enzimas antioxidantes (GPx, GR, GST, GGT e G6PDH).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Nos modelos experimentais foram utilizados ratos machos adultos (60 a 90 dias) da linhagem Wistar provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina e mantidos no biotério setorial de Neuroquímica do Departamento de Bioquímica, em ciclo claro/escuro de 12 horas, com temperatura ambiente entre 22 a 25 °C, com água e ração *ad libitum*. Os procedimentos adotados com os animais seguiram os princípios éticos do COBEA, conforme protocolo (nº 308) aprovado pelo CEUA/UFSC.

3.2. Modelo de isquemia *in vitro*

Os animais foram mortos por decapitação, o cérebro dissecado e os hipocampus rapidamente removidos e mantidos em tampão Krebs-Ringer-Bicarbonato (KRB). Este tampão é composto por: NaCl 122 mM, KCl 3 mM, CaCl₂ 1,3 mM, MgSO₄ 1,2 mM, KH₂PO₄ 0,4 mM, NaHCO₃ 25 mM, D-glicose 10 mM, sendo gaseificado com carbogênio (95 % O₂ e 5 % CO₂) por 15 minutos para atingir o pH 7,4 e, a partir de então, mantido gelado. As fatias com 0,4 mm de espessura foram obtidas utilizando-se um fatiador de tecidos de McIlwain, sendo separadas e colocadas em tubos contendo KRB. Estas foram gaseificadas com carbogênio por aproximadamente 10 segundos para pré-incubação por 30 min a 37 °C. Após a pré-incubação, iniciava-se a incubação,

havendo troca do meio de KRB da pré-incubação pelo tratamento escolhido para cada grupo de fatias em triplicata.

Para obter-se o modelo de isquemia *in vitro*, as fatias de hipocampo foram submetidas à privação de glicose e oxigênio (PGO) através da incubação com um tampão composto por NaCl 122 mM, KCl 3 mM, CaCl₂ 1,3 mM, MgSO₄ 1,2 mM, KH₂PO₄ 0,4 mM e, a glicose utilizada no tampão KRB foi substituída por 10 mM de 2-deoxi-glicose (um análogo não utilizável da glicose) (Pocock e Nichols, 1998). Em seguida, as fatias foram gaseificadas com nitrogênio compondendo, desta maneira, um meio isquêmico.

As fatias foram mantidas por 15 ou 60 minutos em meio fisiológico ou isquêmico e posteriormente, submetidas à reperusão, onde o meio isquêmico foi substituído por tampão KRB gaseificado com carbogênio, no qual as fatias foram mantidas por duas horas. A incubação foi finalizada colocando-se as fatias em banho de gelo (4 °C).

3.3. Tratamento *in vivo* com Zn²⁺ e o modelo de isquemia *ex vivo*

Para o estudo da ação do ZnCl₂ utilizou-se o modelo de isquemia *in vitro*, após o tratamento *in vivo*. Ratos Wistar machos de 60 dias de idade foram tratados com ZnCl₂ diluído em água potável (300 mg/L), com acesso irrestrito por 30 dias. Com este procedimento os animais tinham uma ingesta de 15 a 18 mg/kg de ZnCl₂. Os hipocampus dos animais de 90 dias de idade não tratados, ou após os 30 dias de tratamento com o ZnCl₂, foram utilizados para os experimentos *in vitro* (Tabela 1). Foram realizados no mínimo 3 experimentos independentes em triplicatas.

Tabela 1. Grupos experimentais no tratamento *in vivo* com ZnCl_2 seguido do tratamento *in vitro* no modelo de isquemia.

Grupo	Tratamento <i>in vivo</i> via oral por 30 dias	Hipóxia/Isquemia (min)	Reperusão (min)
1	--	--	--
2	--	15	--
3	--	15	120
4	ZnCl_2	--	--
5	ZnCl_2	15	--
6	ZnCl_2	15	120
7	--	60	--
8	--	60	120
9	ZnCl_2	--	--
10	ZnCl_2	60	--
11	ZnCl_2	60	120

3.4. Tratamento *in vitro* com Zn^{2+} e o modelo de isquemia *in vitro*

Para se verificar a ação do ZnCl_2 no processo de isquemia *in vitro*, os animais passaram pelo mesmo processo de preparação das fatias descrito anteriormente, entretanto, as fatias controles foram incubadas na presença do tampão KRB ou tampão KRB com três diferentes concentrações de ZnCl_2 , gaseificadas com carbogênio por aproximadamente 10 segundos, e mantidas por 15 ou 60 minutos nessas condições. Nos grupos com a presença de ZnCl_2 , este foi mantido durante o período de 2 horas, durante a reperusão (Tabela 2).

As fatias submetidas à PGO foram incubadas no tampão de PGO ou no tampão de PGO com três diferentes concentrações de ZnCl_2 (1, 10 e $100\mu\text{M}$), sendo mantidas nestas condições por 15 ou 60 minutos. Nos grupos submetidos à PGO e reperfusão, a isquemia inicial era realizada apenas com tampão da PGO por 15 ou 60 minutos, que foi posteriormente substituído por tampão KRB ou tampão KRB com ZnCl_2 , gaseificado por aproximadamente 15 segundos com carbogênio e mantidas por 2 horas nestas condições. Nos grupos com a presença de ZnCl_2 , este foi mantido durante o período de reperfusão. A incubação terminava colocando-se as fatias em banho de gelo (4°C). Foram realizados no mínimo 3 experimentos independentes em triplicata.

Tabela 2. Grupos experimentais no tratamento *in vitro* com ZnCl₂ seguido do tratamento *in vitro* no modelo de isquemia.

<i>Grupo</i>	<i>Tratamento in vitro com ZnCl₂ (μM)</i>	<i>Hipóxia/Isquemia (min)</i>	<i>Reperusão (min)</i>
<i>1</i>	--	--	--
<i>2</i>	--	<i>15</i>	--
<i>3</i>	--	<i>15</i>	<i>120</i>
<i>4</i>	<i>1</i>	--	--
<i>5</i>	<i>10</i>	--	--
<i>6</i>	<i>100</i>	--	--
<i>7</i>	<i>1</i>	<i>15</i>	--
<i>8</i>	<i>10</i>	<i>15</i>	--
<i>9</i>	<i>100</i>	<i>15</i>	--
<i>10</i>	<i>1</i>	<i>15</i>	<i>120</i>
<i>11</i>	<i>10</i>	<i>15</i>	<i>120</i>
<i>12</i>	<i>100</i>	<i>15</i>	<i>120</i>
<i>13</i>	--	<i>60</i>	--
<i>14</i>	--	<i>60</i>	<i>120</i>
<i>15</i>	<i>1</i>	<i>60</i>	--
<i>16</i>	<i>10</i>	<i>60</i>	--
<i>17</i>	<i>100</i>	<i>60</i>	--
<i>18</i>	<i>1</i>	<i>60</i>	<i>120</i>
<i>19</i>	<i>10</i>	<i>60</i>	<i>120</i>
<i>20</i>	<i>100</i>	<i>60</i>	<i>120</i>

3.5. Tratamento *in vitro* com quercetina e o modelo de isquemia *in vitro*

O tratamento *in vitro* das fatias com o flavonóide quercetina foi semelhante ao tratamento com Zn^{2+} (Tabela 3). O processo de preparação das fatias foi o mesmo descrito anteriormente. Logo após o período de pré-incubação foi realizado um pré-tratamento com quercetina com quatro diferentes concentrações (3, 10, 30 e 100 μM), diluídas em tampão KRB por 30 minutos e gaseificadas com carbogênio por aproximadamente 15 segundos. Em seguida, foi trocado o meio das fatias por KRB e KRB com as quatro concentrações de quercetina já citadas, compondo os grupos controle, e mantidas por 60 minutos nessas condições.

As fatias submetidas à PGO foram incubadas no tampão de PGO ou no tampão de PGO com as quatro diferentes concentrações de quercetina (3, 10, 30 e 100 μM), gaseificadas com nitrogênio por aproximadamente 15 segundos e mantidas nestas condições por 15 minutos. O tempo de 15 minutos de PGO foi escolhido nos experimentos seguintes, tendo em vista, como demonstrado nos experimentos com Zn^{2+} , que no tempo de 60 minutos de PGO não foi observada nenhuma melhora das variáveis marcadoras de neuroproteção. Nos grupos submetidos à PGO e reperfusão, a isquemia inicial era realizada apenas com tampão da PGO durante 15 minutos e posteriormente, substituído por tampão KRB ou tampão KRB na presença de 3, 10, 30 e 100 μM de quercetina, sendo que as fatias também foram gaseificadas por aproximadamente 15 segundos com carbogênio e mantidas por 2 horas nestas condições. A incubação foi terminada colocando-se as fatias em banho de gelo (4 °C). Foram realizados no mínimo 3 experimentos independentes em triplicata.

Tabela 3. Grupos experimentais no tratamento *in vitro* com quercetina seguido do tratamento *in vitro* no modelo de isquemia.

Grupo	Tratamento <i>in vitro</i> com quercetina (μM)	Hipóxia/Isquemia (min)	Reperusão (min)
1	--	--	--
2	--	15	--
3	--	15	120
4	3	--	--
5	10	--	--
6	30	--	--
7	100	--	--
8	3	15	--
9	10	15	--
10	30	15	--
11	100	15	--
12	3	15	120
13	10	15	120
14	30	15	120
15	100	15	120

3.6. Tratamento *in vitro* com quercetina e o modelo de estresse oxidativo

Para o modelo de estresse oxidativo *in vitro* foi empregado o uso do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que é uma espécie reativa de oxigênio causadora de danos celulares, em três diferentes concentrações (0,25, 1 e 2,5 mM) (Tabela 4).

O processo de preparação das fatias foi o mesmo que o anterior. Logo após o período de pré-incubação foi realizado um pré-tratamento com quercetina em quatro diferentes concentrações 3, 10, 30 e 100 μM , diluídas em tampão KRB por 30 minutos, gaseificadas com carbogênio por aproximadamente 15 segundos. Em seguida, o meio das fatias foi trocado mantendo-se a quercetina por mais 90 minutos nessas condições. Nos grupos sem quercetina o meio KRB renovado após 30 minutos de incubação.

As fatias submetidas ao insulto do H_2O_2 foram incubadas no tampão KRB com as quatro diferentes concentrações de quercetina (3, 10, 30 e 100 μM) em combinação com três diferentes concentrações do H_2O_2 0,25, 1 e 2,5 mM. As fatias foram mantidas nestas condições por 90 minutos. A incubação foi terminada colocando-se as fatias em banho de gelo (4 °C). Foram realizados no mínimo 3 experimentos independentes em triplicatas.

Tabela 4. Grupos experimentais no tratamento *in vitro* com quercetina seguido do tratamento *in vitro* no modelo de estresse oxidativo.

<i>Grupo</i>	<i>H₂O₂ (mM)</i>	<i>Quercetina (μM)</i>
<i>1</i>	--	--
<i>2</i>	<i>0,25</i>	--
<i>3</i>	<i>1,0</i>	--
<i>4</i>	<i>2,5</i>	--
<i>5</i>	--	<i>3</i>
<i>6</i>	--	<i>10</i>
<i>7</i>	--	<i>30</i>
<i>8</i>	--	<i>100</i>
<i>9</i>	<i>0,25</i>	<i>3</i>
<i>10</i>	<i>0,25</i>	<i>10</i>
<i>11</i>	<i>0,25</i>	<i>30</i>
<i>12</i>	<i>0,25</i>	<i>100</i>
<i>13</i>	<i>1,0</i>	<i>3</i>
<i>14</i>	<i>1,0</i>	<i>10</i>
<i>15</i>	<i>1,0</i>	<i>30</i>
<i>16</i>	<i>1,0</i>	<i>100</i>
<i>17</i>	<i>2,5</i>	<i>3</i>
<i>18</i>	<i>2,5</i>	<i>10</i>
<i>19</i>	<i>2,5</i>	<i>30</i>
<i>20</i>	<i>2,5</i>	<i>100</i>

3.7. Avaliação da viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada pelo método de redução do MTT (brometo de 3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio ou Thiazolyl blue). O MTT é um sal de tetrazólio solúvel em água, que é convertido em formazam púrpura insolúvel após clivagem do anel de tetrazólio por desidrogenases mitocondriais (Jacobsson e Fowler, 1999). Após o período de PGO e reperfusão, as fatias hipocâmpais foram incubadas com MTT (0,5 mg/ml) a 37 °C por 20 minutos e o formazam reduzido foi solubilizado pela adição de dimetil-sulfóxido (DMSO) por 30 minutos. A viabilidade celular foi proporcional à leitura da absorbância medida em leitor de Elisa no comprimento de onda de 540 nm.

3.8. Avaliação da permeabilidade celular

A enzima lactato desidrogenase (LDH) é uma enzima citosólica e a avaliação de sua atividade no meio extracelular é um indicativo de aumento da permeabilidade da membrana plasmática. A atividade da LDH no meio extracelular foi medida através de um método cinético (Biotécnica[®]), onde a LDH catalisa a redução do piruvato por NADH, obtendo-se lactato e NAD⁺ (Reação 1). A atividade catalítica foi determinada a partir da velocidade do desaparecimento do NADH, medido através de espectrofotometria com comprimento de onda de 340 nm. A LDH total foi determinada pela adição de 20 µl de Triton X-100 e ruptura mecânica das fatias. Esta atividade foi considerada como 100% (Whitaker, 1969), e os valores expressos em percentagem da atividade total.

Reação 1 – Lactato desidrogenase (LDH)**3.9. Preparação das amostras para análise de glutathiona e tióis protéicos**

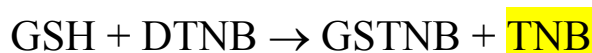
Para a determinação da glutathiona total (GSH-t) e tióis protéicos (PSH) após a incubação, as fatias foram homogeneizadas em ácido perclórico (PCA) 0,5 M, centrifugadas a 15.000 g por 2 minutos, sendo o sobrenadante utilizado para dosar a glutathiona total, enquanto que o pellet foi utilizado para determinação dos tióis protéicos.

3.9.1. Mensuração dos níveis de glutathiona total (GSH-t)

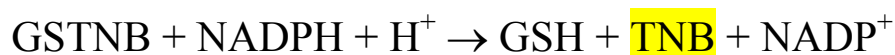
Para a determinação dos níveis de glutathiona total (glutathiona reduzida + oxidada), foi utilizado o método descrito por Tietze (1969), modificado por Akerboom e Sies (1981), conforme esquematizado nas Reações 2-4. Este método baseia-se na reação espontânea do reagente de Ellman (ácido 5,5'-ditiobis, 2-nitrobenzóico - DTNB) com a GSH, formando o ânion cromóforo ácido tionitrobenzóico (TNB) e o conjugado do tiol (GSH) com outro TNB (GSTNB) incolor (Reação 2). GSTNB é clivado enzimaticamente pela glutathiona redutase (GR), utilizando NADPH como cofator (Reação 3). Além de mais uma molécula do cromóforo TNB ser formada, desta reação

resulta o tiol (GSH) que reinicia o ciclo reagindo do DTNB. Portanto, este método é chamado de cíclico, pois enquanto houver reagentes ele é contínuo. Quando glutatona oxidada (GSSG) está presente, primeiramente acontece a Reação 4, para então iniciar as reações 2 e 3.

Reação 2 – Troca tiol-dissulfeto entre GSH e DTNB, gerando o ânion colorido TNB e o dissulfeto misto GSTNB



Reação 3 – Catalisada pela enzima glutatina redutase (GR), gera um segundo ânion TNB e GSH, que pode reiniciar o ciclo na Reação 2



Reação 4 – Redução do dissulfeto da glutatona (GSSG), catalisada pela enzima glutatina redutase (GR)



Após a centrifugação da amostra, o sobrenadante foi retirado e neutralizado diluindo-o 5 vezes em tampão fosfato de potássio 0,25 M, pH 7,0. O meio de reação utilizado foi composto por fosfato de potássio 0,1 M, EDTA 1 mM, pH 7,0, ácido 5, 5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) 0,1 mM, NADPH 0,235 mM, GR 0,2 U/ml. Uma curva padrão com GSSG serviu para comparação com a leitura de equivalentes de GSH-t. A leitura foi realizada por espectrofotometria a 37 °C por 5 min, com comprimento de onda de 412 nm (Dafre, 1996). Os resultados foram expressos em percentagem do controle.

3.9.2. Quantificação dos tióis protéicos (PSH)

O método utilizado para avaliação dos tióis protéicos baseia-se no fato de que as proteínas desnaturadas expõem seus grupos -SH. Após precipitação das proteínas com ácido perclórico 0,5 M, ao “pellet” adicionou-se 1 mL de uma solução contendo tampão Tris/HCl 0,5 M, pH 8,0, SDS 0,1 % e EDTA 1 mM e novamente homogeneizado. As amostras foram incubadas com 0,1 mM de ácido ditionitrobenzóico - DTNB (reagente de Ellman) em temperatura ambiente por 30 minutos. A absorbância basal foi determinada através da leitura de uma amostra sem a adição do reagente de Ellman. As amostras foram lidas em espectrofotômetro a 412 nm, utilizando-se um coeficiente de extinção molar de $13.600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para o ácido tio-nitrobenzóico, liberado na reação do reagente de Ellman com os tióis protéicos (Hu, 1994), similar àquela descrita para a reação da GSH com o DTNB (Reação 2).

3.10. Preparação das amostras para avaliação da atividade das enzimas antioxidantes

Para determinar a atividade das enzimas antioxidantes (GPx, GR, GST, GGT e G6PDH), as fatias submetidas aos modelos de PGO e estresse oxidativo *in vitro*, foram homogeneizadas em 300 µl de tampão HEPES 20 mM, pH 7,0 e centrifugados a 15.000 g por 10 minutos em centrífuga refrigerada (4 °C). O sobrenadante e o pellet foram separados, sendo os precipitados utilizados para dosar a enzima GGT e o sobrenadante usado para dosar as demais enzimas.

3.10.1. Avaliação da atividade da enzima glutathiona peroxidase (GPx)

De acordo com o método de Wendel (1981), a GPx catalisa a redução do peróxido de tert-butila (t-BOOH), utilizando a glutathiona reduzida (GSH) como co-substrato para produzir glutathiona oxidada (GSSG; Reação 5). A redução da GSSG formada nesta reação é imediatamente catalisada pela GR, que foi adicionada em excesso ao meio de reação 4. O consumo de NADPH pela GR pode ser acompanhado em 340 nm. O consumo de NADPH é proporcional à atividade GPx. O consumo basal de NADPH, na ausência do substrato (t-BOOH) é considerado como consumo inespecífico. Para este ensaio, o meio de reação contém tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0, 1 mM EDTA, GSH 1 mM, NADPH 0,225 mM e GR 0,2 U/ml. Ao decréscimo de absorbância por minuto obtido descontou-se o consumo inespecífico de NADPH. O valor obtido foi dividido pelo coeficiente de extinção molar do NADPH ($\epsilon = 6.220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e multiplicado pelas diluições. O valor foi expresso como mUnidades/mg de proteína. Uma Unidade corresponde a 1 $\mu\text{mol/ml/min}$.

Reação 5 – Atividade glutathiona peroxidase (GPx)



3.10.2. Avaliação da atividade da enzima glutathiona redutase (GR)

A GR catalisa a redução da glutathiona oxidada (GSSG) em glutathiona reduzida (GSH) através do consumo do NADPH (Reação 4). Ao utilizar o substrato GSSG, a enzima leva ao consumo de NADPH, que é acompanhado em 340 nm. A velocidade de

consumo do NADPH, em condições de saturação, expressa a atividade enzimática (Carlberg e Mannervik, 1985). O meio de reação contém tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0, 1 mM de EDTA e NADPH 0,225 mM. Após adicionar a amostra, o consumo inespecífico de NADPH foi medido por 5 minutos a 340 nm. Ao adicionar o substrato GSSG 1 mM, a leitura foi realizada nos 5 minutos seguintes. Do decaimento por minuto obtido descontou-se o consumo inespecífico de NADPH. O valor obtido foi dividido pelo coeficiente de extinção molar do NADPH ($\epsilon = 6.220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e multiplicado pelas diluições. O valor foi expresso como mUnidades/mg de proteína. Uma Unidade corresponde a 1 $\mu\text{mol/ml/min}$.

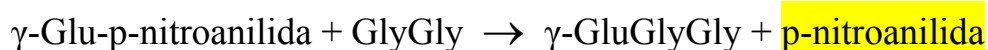
3.10.3. Avaliação da atividade da enzima glutathiona S-transferase (GST)

A GST catalisa a conjugação da GSH com o substrato sintético 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) que produz um conjugado que é detectado em 340 nm. A atividade enzimática é proporcional à velocidade de produção do composto conjugado (Habig e Jakoby, 1981). Para este ensaio, o meio de reação continha tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0, 1 mM de EDTA e GSH 1 mM. Foram feitas leituras independentes realizadas por 5 minutos para mensurar a velocidade da reação espontânea do CDBN com GSH, neste caso, sem a presença da amostra. Depois de acrescentar a amostra e o segundo substrato (CDNB 1 mM) ao meio de reação, realizou-se a leitura por 5 minutos a 340 nm. Ao decaimento por minuto obtido com a amostra, descontou-se a velocidade da reação espontânea. O valor obtido pelo coeficiente de extinção molar do conjugado GSH/CDNB ($\epsilon = 9.600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) foi multiplicado pelas diluições. O valor foi expresso como mUnidades/mg de proteína. Uma Unidade corresponde a 1 $\mu\text{mol/ml/min}$.

3.10.4. Avaliação da atividade da enzima γ -glutamil transpeptidase (GGT)

Para determinação da enzima GGT, o precipitado da centrifugação de preparação das amostras foi ressuspenso em 250 μ l de tampão HEPES 20 mM pH 7,0. Às amostras foi adicionado γ -glutamil-p-nitroanilida e o dipeptídeo glicil-glicina (GlyGly). O processo se dá devido a transferência da porção γ -glutamil do substrato γ -glutamil-p-nitroanilida ao dipeptídeo GlyGly liberando o componente colorido p-nitroanilida (Reação 6), que pode ser detectado espectrofotometricamente a 410 nm. A formação da cor ($\epsilon = 8.800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) é diretamente proporcional à atividade da enzima (Meister *et al*, 1981).

Reação 6 – Atividade γ -glutamil transpeptidase (GGT) no meio de reação



3.10.5. Avaliação da atividade da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH)

A G6PDH, na presença de glicose-6-fosfato, leva a formação de NADPH a partir do NADP^+ com conseqüente aumento de absorbância que é medido em 340nm (Glock e McLean, 1953). O meio de reação contém 3 mM de cloreto de magnésio, 10 mM de

glicose-6-fosfato; 0,2 mM de NADP^+ em tampão Tris/HCl 50 mM, pH 7,8. Do acréscimo na absorbância por minuto obtido descontou-se a produção inespecífica de NADPH. O valor obtido foi dividido pelo coeficiente de extinção molar do NADPH ($\epsilon = 6.220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e multiplicado pelas diluições. O valor foi expresso como mUnidades/mg de proteína. Uma Unidade corresponde a $1 \mu\text{mol/ml/min}$.

3.11. Análise estatística

Os resultados obtidos foram avaliados através da análise ANOVA de uma via, seguido pelo Teste de Duncan, quando apropriado. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Efeito do tratamento *in vivo* com ZnCl_2 e o modelo de isquemia *ex vivo*

Como evidenciado em pesquisas anteriores, o Zn^{2+} quando em tratamento crônico leva a um aumento considerável de sua concentração na fenda sináptica de células hipocâmpais, podendo variar em cada uma das suas subregiões (Szewczyk *et al.*, 2006; Frederickson *et al.*, 2000). Para avaliar o possível efeito neuroprotetor do Zn^{2+} , ratos machos de 60 dias de idade foram tratados por trinta dias com ZnCl_2 (300 mg/L; p.o.). O modelo de isquemia, em que fatias de hipocampo são submetidas à privação de glicose e oxigênio (PGO), foi utilizado para testar se o tratamento crônico com ZnCl_2 protegeria as fatias de hipocampo de ratos adultos contra um insulto agudo por PGO.

As fatias de hipocampo de ratos submetidas à PGO por 15 minutos (Figura 7A), tiveram uma queda significativa da viabilidade celular de aproximadamente 20%, enquanto que após 60 minutos (Figura 7B) a queda foi de cerca de 40 %. O tratamento *in vivo* com ZnCl_2 não alterou a resposta à PGO *ex vivo*. Após a PGO um grupo de fatias hipocâmpais foi submetido a 2 horas de reperfusão. A queda de viabilidade resultante da PGO *ex vivo* não foi alterada pela reperfusão, tanto no grupo de 15, quanto no de 60 minutos de PGO. O tratamento *in vivo* com ZnCl_2 , à semelhança da PGO, também não alterou o padrão de viabilidade após as 2 horas de reperfusão.

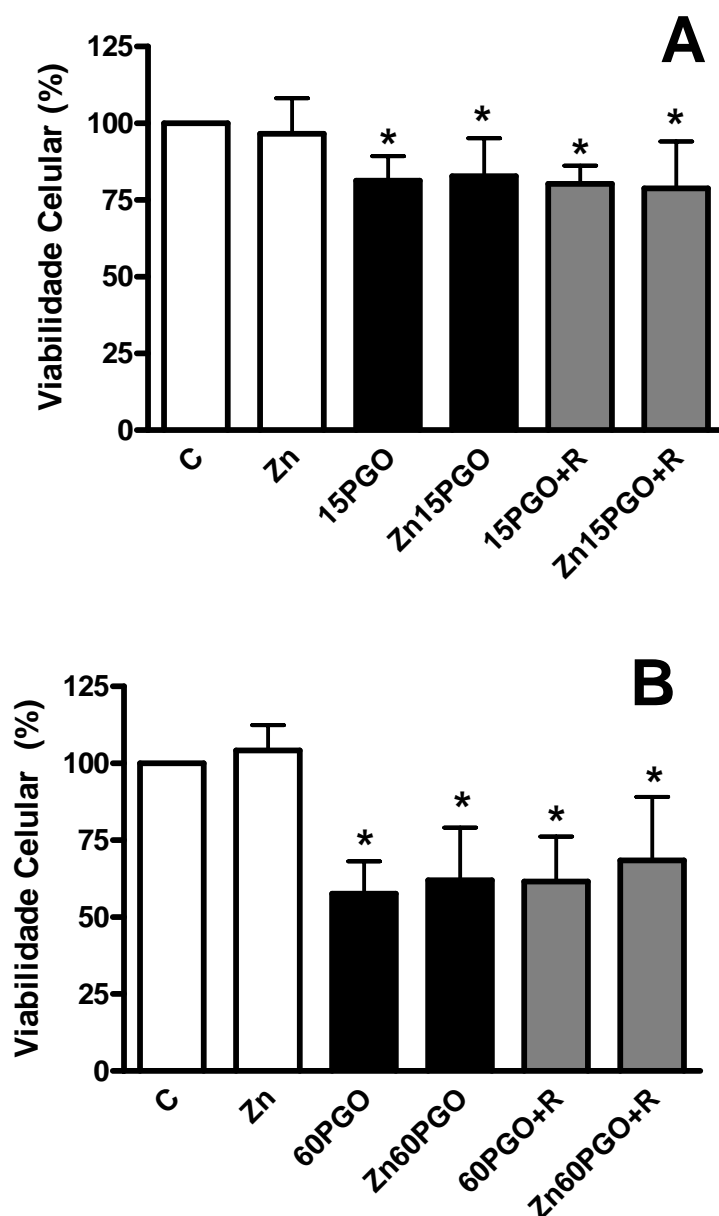


Figura 7. Avaliação da viabilidade celular em fatias de hipocampo de ratos, tratados por 30 dias com ZnCl_2 (300 mg/L; p.o.), submetidas *in vitro* a PGO. Fatias foram incubadas na situação controle (C) ou após 15 (A) ou 60 (B) minutos de PGO (15PGO ou 60PGO, respectivamente). Um subgrupo de fatias foi tratado em um tampão de reperfusão por um período de 2 horas, após um período inicial de PGO de 15 (15PGO+R) ou de 60 (60PGO+R) minutos. Animais tratados *in vivo* com ZnCl_2 foram submetidos aos mesmos tratamentos *in vitro*: controle (Zn), 15 (Zn15PGO) ou 60 (Zn60PGO) minutos de PGO, seguidos de 2 horas de reperfusão (Zn15PGO+R; Zn60PGO+R). A avaliação da viabilidade celular foi realizada conforme descrito nos Materiais e Métodos. Os valores representam a média + desvio padrão de 5 experimentos realizados em triplicata. * indica médias diferentes do controle; $p < 0,05$ (ANOVA de uma via seguido do teste de Duncan).

A avaliação da permeabilidade celular foi medida através da atividade extracelular da enzima lactato desidrogenase (LDH), em fatias de hipocampo de ratos sem tratamento e tratados com ZnCl_2 e submetidas à PGO por 15 e 60 minutos, bem como, seguidas por reperfusão (Figura 8).

Similar aos dados de viabilidade celular, a liberação de LDH foi mais acentuada no período de hipóxia/isquemia (PGO) passando de aproximadamente 2-3 % de liberação de LDH nas fatias controle para aproximadamente 8 % após 15 minutos de PGO e este valor aumenta para 12-15 % no período de reperfusão (Figura 8A). O mesmo fenômeno se repetiu na situação de 60 minutos de PGO e reperfusão (Figura 8B).

A incubação das fatias por 15 minutos (Figura 8A) no tampão isquêmico provocou a mesma liberação de LDH do que quando submetidas à PGO por 60 minutos (Figura 8B), indicando que a maior parte do dano acontece nos primeiros minutos de isquemia. Da mesma forma que com a viabilidade celular, o tratamento *in vivo* com ZnCl_2 não alterou a liberação da enzima LDH em nenhum dos tratamentos testados.

Desta maneira, através da avaliação da viabilidade e da permeabilidade celular pode-se observar que o tratamento *in vivo* com ZnCl_2 não protegeu as fatias de hipocampo de ratos contra a redução da viabilidade celular e aumento da liberação de LDH provocados pela privação de glicose e oxigênio, ou pela reperfusão *ex vivo*.

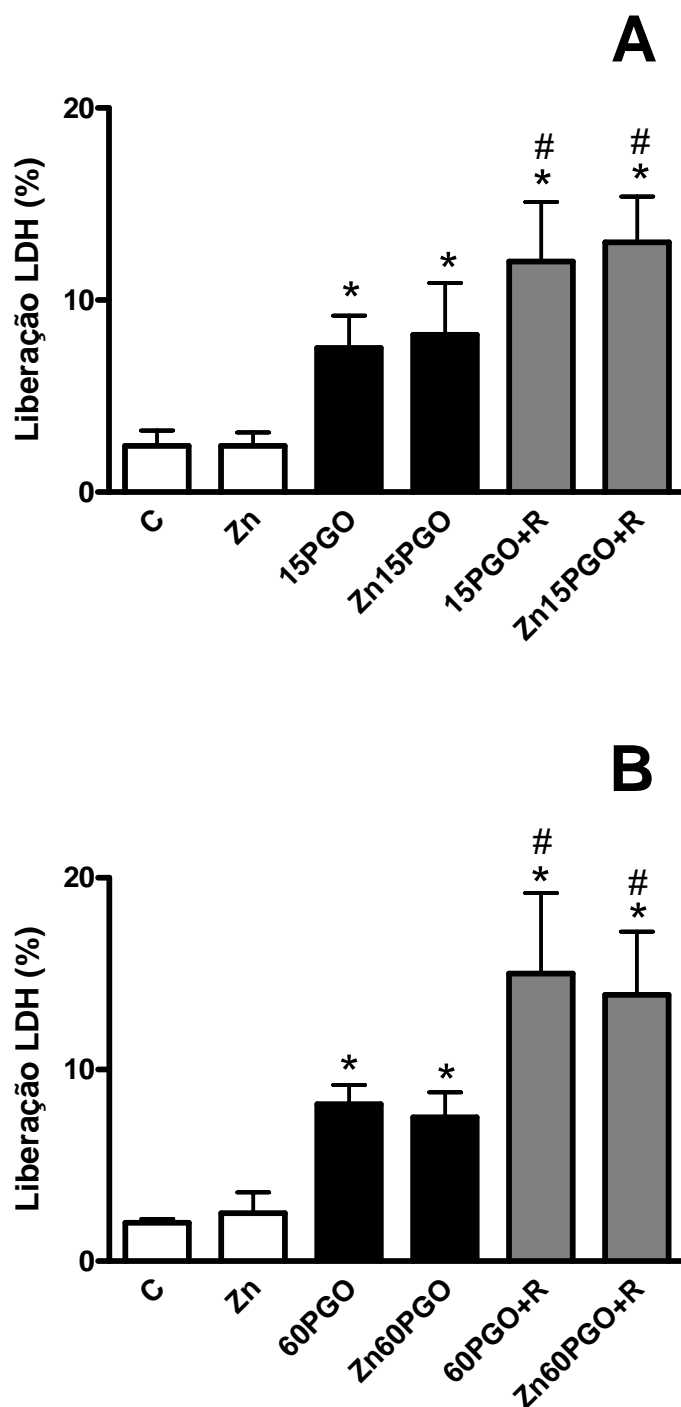


Figura 8. Avaliação da permeabilidade celular em fatias de hipocampo de ratos tratados por 30 dias com ZnCl_2 (300 mg/L, p.o.), e submetidas *in vitro* a PGO por 15 (A) ou 60 (B) minutos. Legenda como apresentado na Figura 7. A avaliação da permeabilidade celular foi realizada conforme descrito nos Materiais e Métodos. Os valores representam a média + desvio padrão de 3 experimentos realizados em triplicata. * indica médias diferentes do controle e # indica diferença do grupo PGO (15PGO ou 60PGO); $p < 0,05$ (ANOVA de uma via seguido do teste de Duncan).

O tratamento *in vivo* com ZnCl_2 não alterou os níveis de tióis, quando medidos em fatias de hipocampo (Figura 9). Quando as fatias foram submetidas à PGO também não houve alteração nos níveis de GSH-t em nenhuma das condições testadas. A exposição à PGO por 15 minutos seguida de reperfusão (Figura 9A) não alterou os níveis de GSH-t, entretanto na reperfusão houve uma tendência à redução dos níveis de GSH-t. Esta tendência foi confirmada em dois outros experimentos (Figura 13 e 22), onde a redução nos níveis de GSH-t foi significativa. Os níveis de GSH-t foram ainda mais reduzidos (35-45 % de redução) após 60 minutos PGO e 2 horas de reperfusão (Figura 9B). O tratamento *in vivo* com ZnCl_2 não alterou esta resposta.

Não foram observadas alterações nos tióis protéicos (PSH) em nenhum dos tratamentos, quando comparados ao grupo controle (Figura 10A e B).

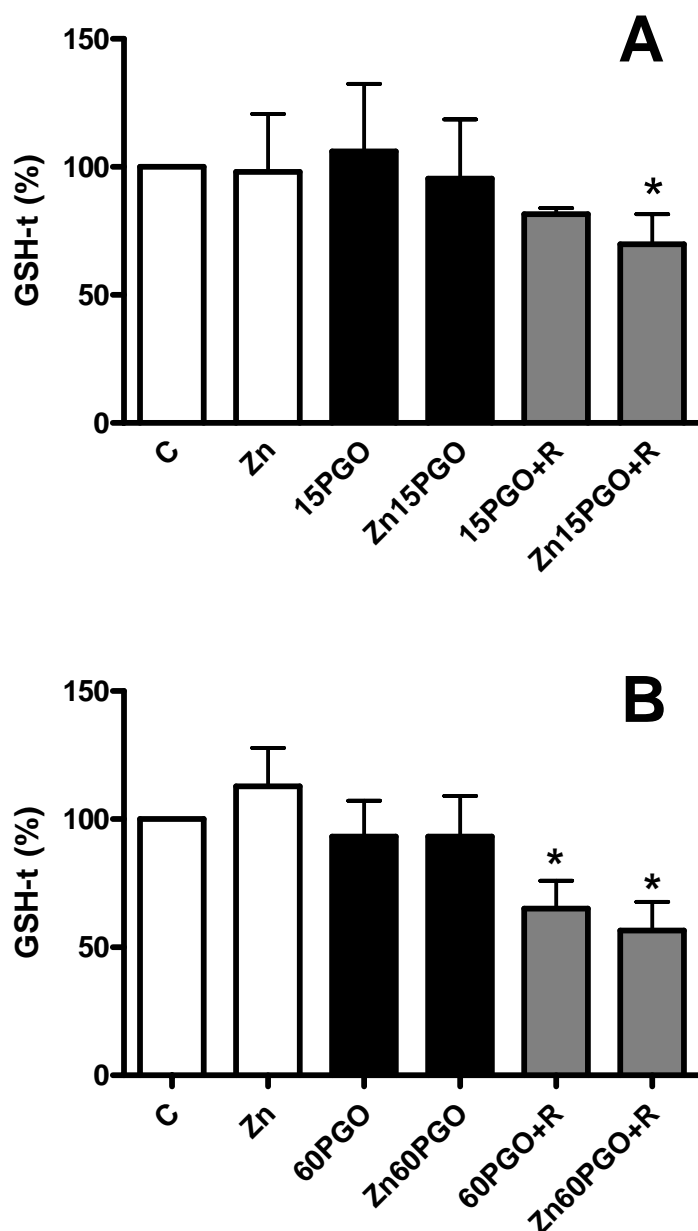


Figura 9. Determinação do conteúdo de GSH-t em fatias de hipocampo de ratos submetidas PGO por 15 (A) ou 60 (B) minutos no tratamento *in vivo* com ZnCl_2 (300 mg/L; p.o.). Legenda como apresentado na Figura 7. A determinação do conteúdo de GSH-t foi realizada conforme descrito nos Materiais e Métodos. Os valores representam a média + desvio padrão de 3 experimentos realizados em triplicata. * indica médias diferentes do controle (C). $P < 0,05$ (ANOVA de uma via seguido do teste de Duncan).

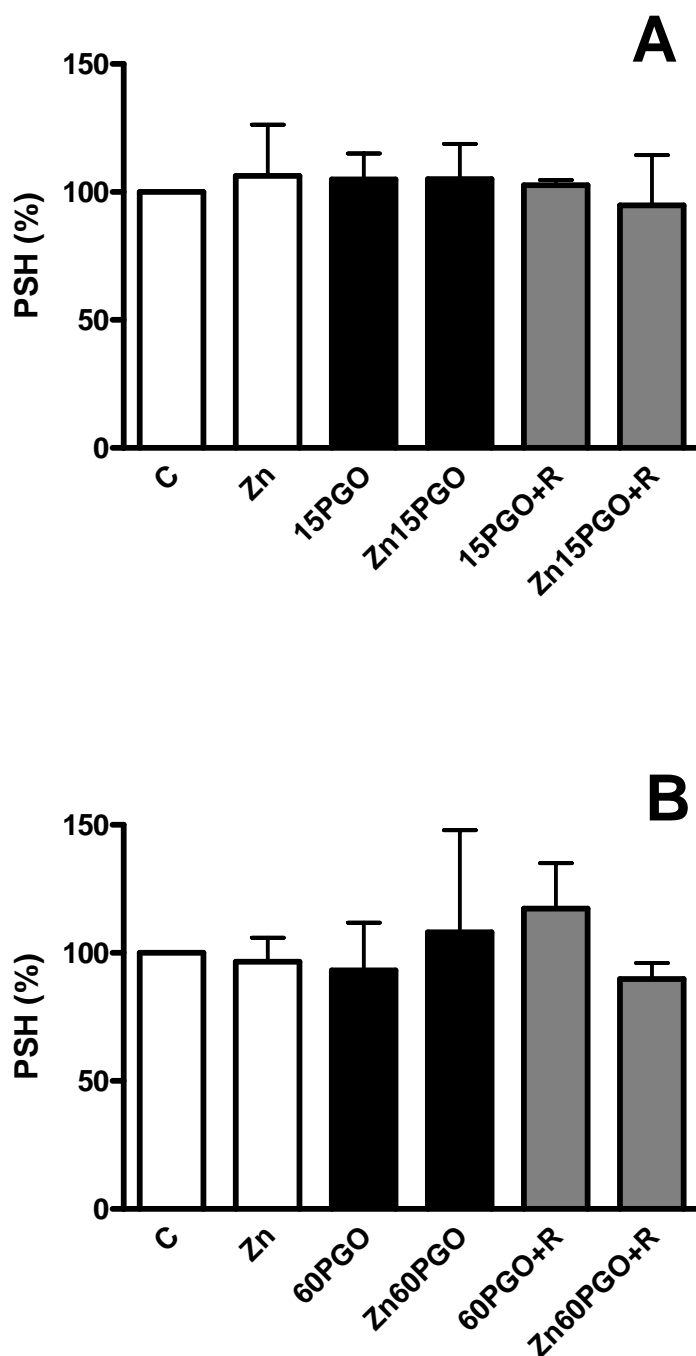


Figura 10. Determinação do conteúdo de PSH em fatias de hipocampo de ratos submetidas a 15 (A) ou 60 (B) minutos de PGO no tratamento *in vivo* com ZnCl_2 (300mg/L; p.o.). Legenda como apresentado na Figura 7. A determinação do conteúdo de PSH foi realizada conforme descrito nos Materiais e Métodos. Os valores representam a média + desvio padrão de 3 experimentos realizados em triplicata. $p < 0,05$ (ANOVA de uma via seguido do teste de Duncan).

4.2. Efeito do tratamento *in vitro* com ZnCl_2 e o modelo de isquemia *in vitro*

Como não se evidenciou neuroproteção com o tratamento *in vivo* com ZnCl_2 , foram então realizados experimentos para se avaliar a possível ação neuroprotetora da exposição *in vitro* ao ZnCl_2 , no mesmo modelo de isquemia em fatias de hipocampo anteriormente analisado.

As fatias de hipocampo de ratos que foram submetidas ao tratamento *in vitro* com ZnCl_2 tiveram alterações significativas diferentes das anteriormente observadas com o tratamento *in vivo*, quanto à avaliação da viabilidade celular (Figura 11). Similar ao que foi demonstrado na figura 7A, a PGO de 15 minutos, seguida ou não de reperusão, leva a uma redução da viabilidade celular. Na presença ZnCl_2 1, 10 e 100 μM não houve alteração da resposta à PGO, ou seja, a redução da viabilidade foi similar àquela causada pela PGO. No período de 2 horas de reperusão a redução de viabilidade das fatias de hipocampo não foi alterada pela exposição a 1 μM , entretanto as concentrações de 10 e 100 μM ZnCl_2 apresentaram uma tendência a neuroproteção, uma vez que a viabilidade das fatias hipocampais se aproximaram às do grupo controle.

Como mostrado na Figura 7B e 11B, 60 minutos de PGO produzem uma maior redução na viabilidade das fatias de hipocampo, redução esta que é mantida no período de reperusão. Quando as fatias de hipocampo foram expostas à PGO por 60 minutos, o leve efeito neuroprotetor do Zn^{2+} não mais foi observado, ao invés disto, a concentração de 100 μM acentuou a toxicidade induzida pela PGO (Figura 11B). Assim, o ZnCl_2 parece ter um efeito dual, ou seja, oferecer proteção neste parâmetro em situações de danos menos acentuado, entretanto, apresenta um claro efeito neurotóxico na maior concentração testada (100 μM), provavelmente agravando os danos causados pela PGO.

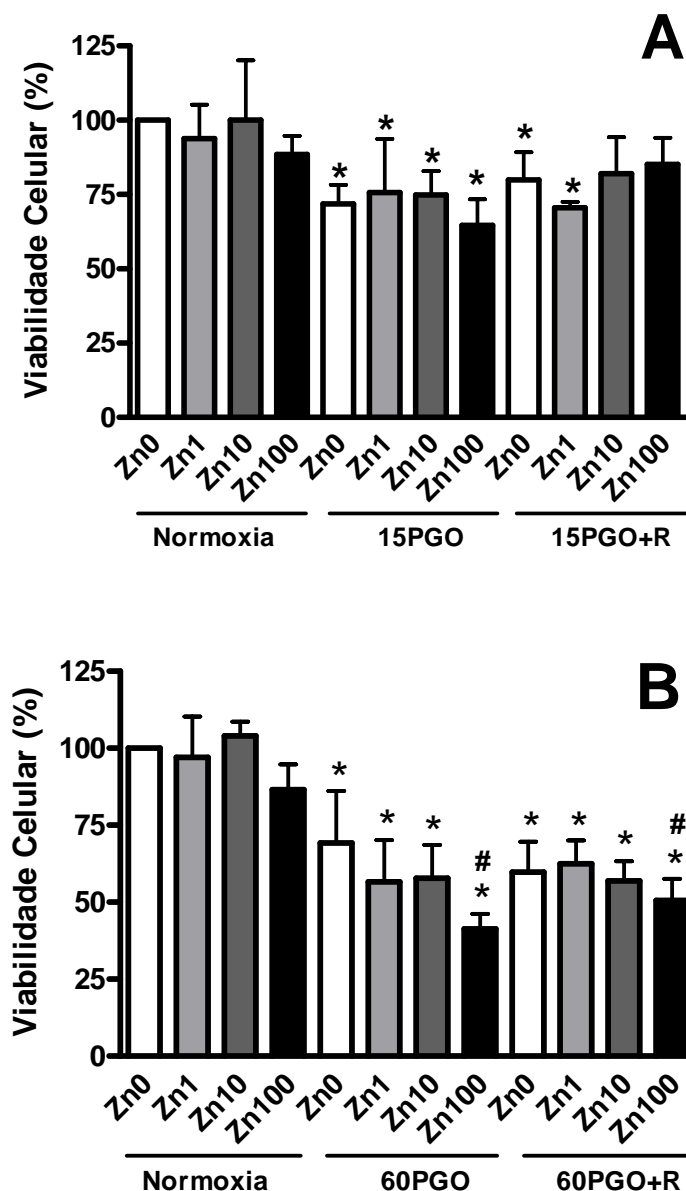


Figura 11. Avaliação da viabilidade celular em fatias de hipocampo de ratos submetidas a 15 (A) ou 60 (B) minutos de PGO no tratamento *in vitro* com ZnCl_2 . Fatias incubadas na situação controle (Normóxia), tratadas na ausência (Zn0) ou na presença de diferentes concentrações de ZnCl_2 1, 10 e 100 μM (Zn1, Zn10 e Zn100, respectivamente). As fatias de hipocampo foram submetidas a 15 (15PGO) e 60 (60PGO) minutos de PGO, seguidos de 2 horas de perfusão (15PGO+R ou 60PGO+R, respectivamente). A avaliação da viabilidade celular foi realizada conforme descrito nos Materiais e Métodos. Os valores representam a média + desvio padrão de 4 experimentos realizados em triplicata. * indica diferenças significativas do grupo Normóxia (Zn0); # indica diferença significativa do grupo Zn0, para a condição de 60PGO. $p < 0,05$ (ANOVA de uma via seguido do teste de Duncan).

Para a confirmação dos dados apresentados quanto à viabilidade celular, foi feita a avaliação da permeabilidade celular com a submissão das fatias a 15 ou 60 minutos de isquemia *in vitro*, seguidas ou não de perfusão, e foi determinada a liberação da enzima LDH do citosol das células hipocâmpais para o meio de incubação. Da mesma forma que apresentado na Figura 8, houve um aumento estatisticamente significativo na liberação de LDH após 15 ou 60 minutos de PGO, e aumentado também no período de perfusão (Figura 12). Houve uma tendência de redução na liberação de LDH nas fatias tratadas com ZnCl_2 e expostas à PGO por 15 ou 60 minutos (Figura 12A e B). No período de perfusão, após 15 minutos de PGO e na concentração de 100 μM , a liberação de LDH permaneceu em nível similar ao do grupo 15PGO, indicando uma proteção total no período de perfusão. Já no período de perfusão após 60 minutos de PGO, o efeito foi ligeiramente menor, entretanto apresentando diferença estatística entre o grupo de 60PGO+R quando comparado ao grupo 60PGO+R tratado com ZnCl_2 100 μM . As outras concentrações de ZnCl_2 não produziram efeitos detectáveis estatisticamente.

Comparando-se os dois testes de avaliação de condição celular, viabilidade através do método de MTT e permeabilidade celular através da liberação de LDH, percebe-se que as alterações causadas no período de perfusão são menos facilmente percebidas pelo teste do MTT, uma vez que os valores não se alteram no período de perfusão, em relação ao período de PGO. Já a liberação de LDH é acentuada tanto no período de PGO, quanto no período de perfusão. O teste de MTT detectou uma tendência de proteção do ZnCl_2 somente no período de perfusão, após 15 minutos de PGO, e detectou um efeito tóxico do ZnCl_2 100 μM no experimento de PGO de 60 minutos, seguido ou não de perfusão. Contrariando esta tendência, o tratamento com ZnCl_2 100

μM produziu um efeito neuroprotetor no teste de liberação de LDH, tanto no grupo exposto à reperfusão após 15 ou 60 minutos de PGO.

Estes dados reforçam a idéia de um papel dual do Zn^{2+} , uma vez que se sabe que ele tem um efeito neuroprotetor *in vivo* (Brocardo et al., 2005; 2007; Franco *et al.*, 2008a). Entretanto, dependendo do tratamento, também são observados efeitos neurotóxicos (Brocardo et al., 2005). Da mesma forma, *in vitro*, o efeito neuroprotetor e neurotóxico do ZnCl_2 é facilmente observado.

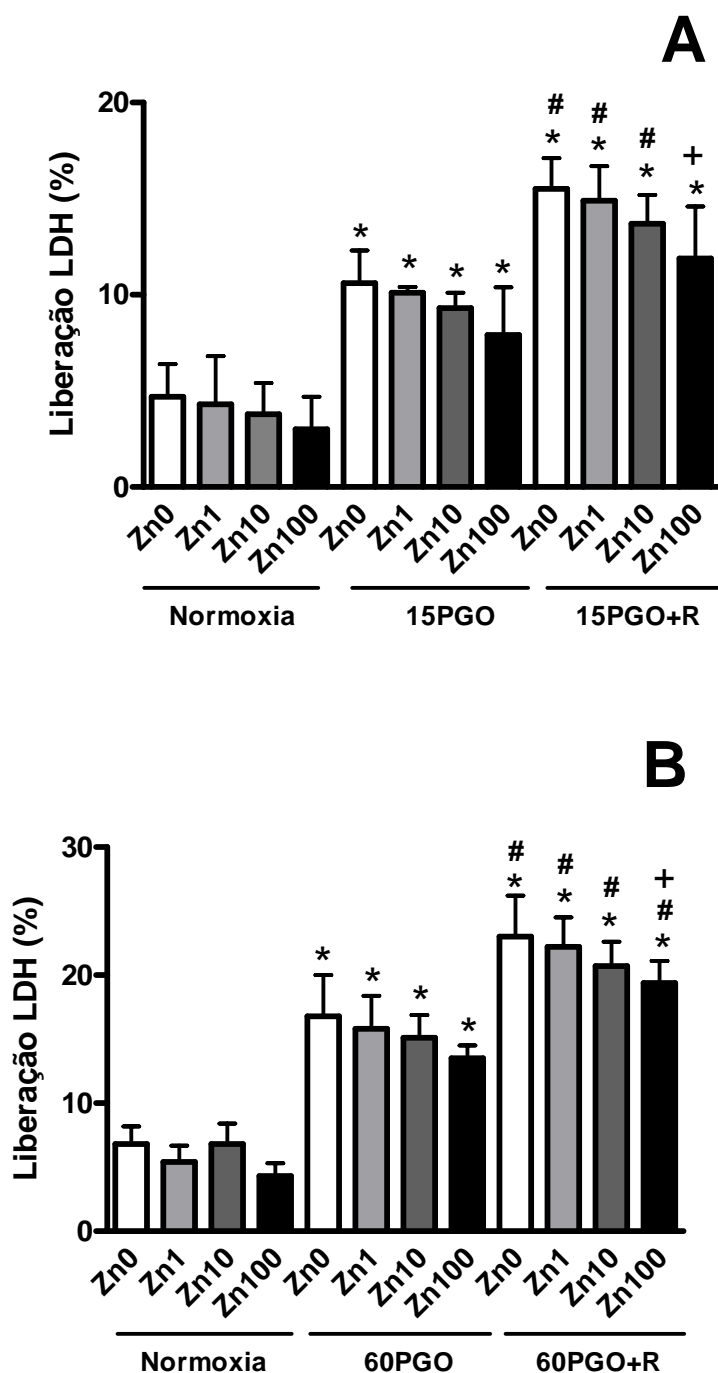


Figura 12. Avaliação da permeabilidade celular em fatias de hipocampo de ratos submetidas a 15 (A) ou 60 (B) minutos de PGO no tratamento *in vitro* com ZnCl_2 . Legenda como apresentado na Figura 11. A avaliação da permeabilidade celular foi realizada conforme descrito nos Materiais e Métodos. Os valores representam média + desvio padrão de 4 experimentos feitos em triplicatas. * indica médias diferentes do controle; # indica médias diferentes de 15PGO (A) ou 60PGO (B); + indica média diferente de 15PGO+R (A) ou 60PGO+R (B). $p < 0,05$ (ANOVA de uma via seguido do teste de Duncan).

As fatias de hipocampo de ratos tratadas com ZnCl_2 e submetidas ao modelo de isquemia *in vitro* foram também avaliadas para determinar os níveis de GSH-t e PSH. O conteúdo da GSH-t foi significativamente reduzido, em relação ao grupo controle, nos grupos expostos a 15 ou 60 minutos de PGO seguido de reperfusão (Figura 13A e B). Houve uma tendência não significativa de redução nos níveis de GSH-t no grupo PGO 60 minutos. Houve, também, uma tendência a uma maior redução nos níveis de GSH-t nos grupos tratados com ZnCl_2 no período de reperfusão, em todas as concentrações (1, 10 e 100 μM) após 15 minutos de PGO e na concentração de 100 μM após 60 minutos de PGO.

Na determinação do conteúdo de PSH, as fatias submetidas a 15 ou 60 minutos de PGO não apresentaram nenhuma alteração significativa em nenhum dos grupos estudados, quando comparados ao grupo controle. No período de reperfusão, sem a exposição ao Zn^{2+} , ou na concentração de 1 μM ZnCl_2 , também não houve alteração nos níveis de PSH, podendo-se apenas observar uma redução nos níveis de PSH, em relação ao grupo controle, nos grupos submetidos a reperfusão após 15 ou 60 minutos de PGO e nas concentrações de ZnCl_2 de 10 e 100 μM (Figura 14A e B).

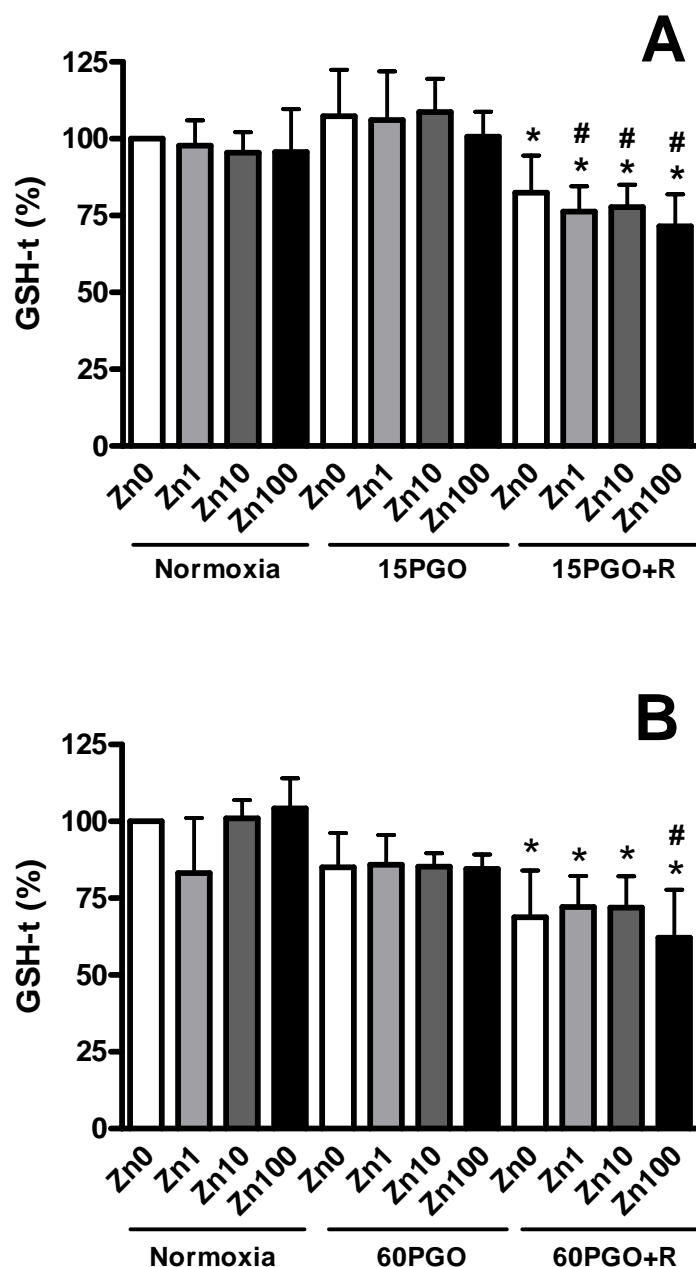


Figura 13. Determinação do conteúdo de GSH-t em fatias de hipocampo de ratos submetidas a 15 (A) ou 60 (B) minutos de PGO no tratamento *in vitro* com ZnCl_2 . Legenda como apresentado na Figura 11. A avaliação dos níveis de GSH-t foi realizada conforme descrito nos Materiais e Métodos. Os valores representam média + desvio padrão de 3 a 4 experimentos feitos em triplicatas. * indica médias diferentes do controle; # indica médias diferentes de 15PGO (A) ou 60PGO (B); $p < 0,05$ (ANOVA de uma via seguido do teste de Duncan).

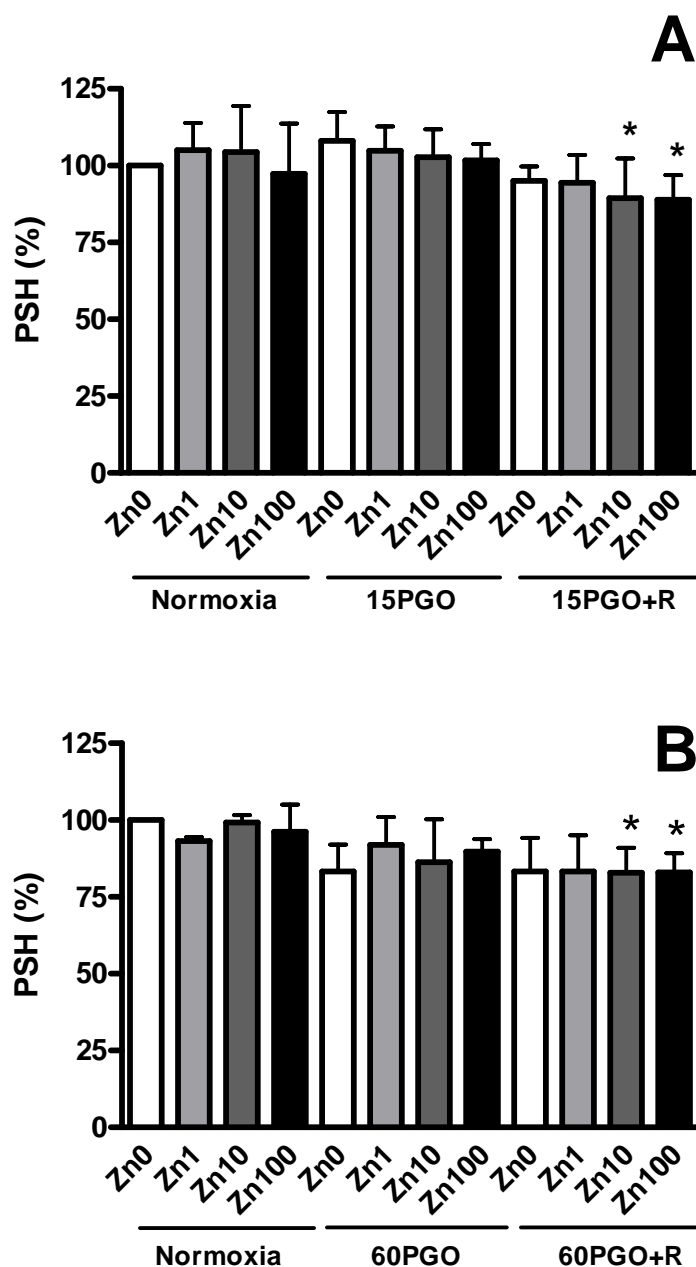


Figura 14. Determinação do conteúdo de PSH em fatias de hipocampo de ratos submetidas a 15 (A) ou 60 (B) minutos de PGO no tratamento *in vitro* com ZnCl_2 . Legenda como apresentado na Figura 11. A avaliação dos níveis de PSH foi realizada conforme descrito nos Materiais e Métodos. Os valores representam média + desvio padrão de 3 a 5 experimentos feitos em triplicata. * indica médias diferentes do controle; $p < 0,05$ (ANOVA de uma via seguido do teste de Duncan).

4.3. Efeito da resposta à PGO pelo tratamento *in vitro* com inibidores da glutathione redutase: ZnCl_2 e BCNU

Em trabalho anterior com o modelo de isquemia em fatias hipocâmpais observou-se que a atividade das enzimas antioxidantes GPx, GR e catalase não foram alteradas pela PGO ou pela reperfusão (Brongholi *et al.*, 2006), entretanto, houve um aumento na atividade da superóxido dismutase durante a PGO. Neste sentido, não houve a necessidade de se determinar a atividade destas enzimas no presente trabalho. Como já descrito na literatura, o Zn^{2+} é capaz de inibir a enzima glutathione redutase (Mize e Langdon *et al.*, 1962; Borowski, 2006; Franco *et al.*, 2006). Com a finalidade de investigar se esta redução na atividade da GR é um fenômeno relevante para a toxicidade do Zn^{2+} , fatias de hipocampo foram tratadas com um inibidor desta enzima, a carmustina ou BCNU. Como um teste da especificidade da ação do ZnCl_2 e do BCNU sobre a GR, o seu efeito também foi avaliado sobre a atividade de outras enzimas antioxidantes ou auxiliares como: glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferase (GST), γ -glutamyl transpeptidase (GGT) e glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH). As mesmas medidas foram realizadas após a exposição das fatias ao inibidor da GR, o BCNU. Apesar de o BCNU atingir outros alvos biológicos, tais como a alquilação de DNA e de RNA, é um composto modelo para o estudo da função da GR (Kehrer, 1983; Bishop *et al.*, 2007).

Para avaliar a ação do ZnCl_2 e do BCNU sobre a atividade de enzimas antioxidantes foram realizados experimentos nos períodos de 1 hora e 3 horas de incubação. Na Figura 15A, pode-se observar que a adição de ZnCl_2 100 μM por 1 hora diminuiu a atividade da enzima GR nas fatias de hipocampo, resultado semelhante foi encontrado após 3 horas de incubação (Figura 15A). As concentrações de 1 e 10 μM

ZnCl₂ não alteraram a atividade da GR. Como esperado, o BCNU, um conhecido inibidor da GR, levou a uma diminuição acentuada em sua atividade, tanto após 1 como após 3 horas de incubação (Figura 15B).

O composto BCNU foi diluído em etanol absoluto, fazendo-se, desta maneira, necessário avaliar seu efeito sobre a viabilidade das fatias do hipocampo de ratos adultos. Como demonstrado na Figura 16, o etanol 0,25 % não influenciou a viabilidade em nenhum dos grupos testados. A partir destes dados, passamos a utilizar fatias tratadas com o veículo (0,25 % de etanol) como grupo controle para os tratamentos com o BCNU.

Nos dados analisados tanto na viabilidade celular quanto na permeabilidade celular, o BCNU não alterou os níveis basais, nem a resposta à PGO, entretanto provocou uma maior redução na viabilidade após a PGO seguida de reperfusão (Figura 16A). Entretanto, quando foi analisada a liberação de LDH, o BCNU não alterou a resposta a PGO ou a PGO seguida de reperfusão em nenhum grupo testado (Figura 16B).

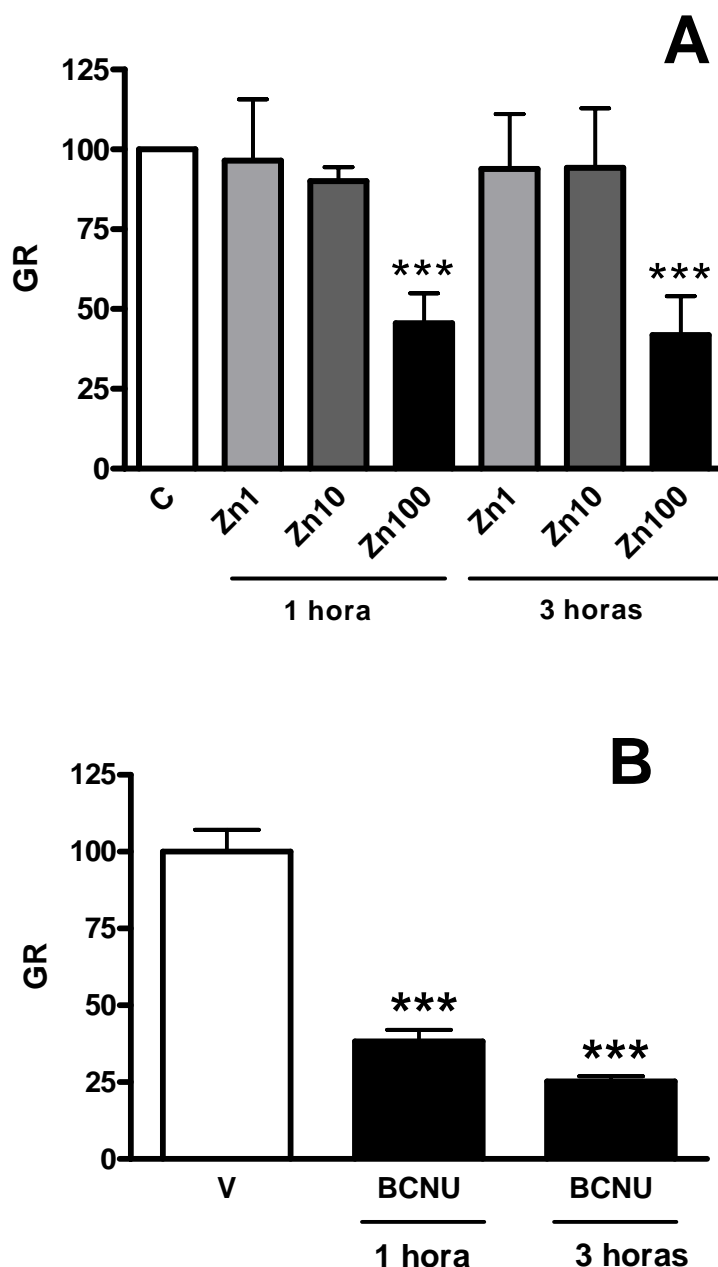


Figura 15. Ação do ZnCl_2 (A) ou do BCNU (B) sobre a atividade da enzima glutathione redutase (GR) em fatias de hipocampo de ratos. (A) As fatias de hipocampo foram incubadas na situação em tampão fisiológicos (C), ou com 1, 10 e 100 μM de ZnCl_2 durante 1 ou 3 horas; (B) As fatias foram incubadas com 0,25 % de etanol, veículo do BCNU (V) ou com 200 μM de BCNU por 1 ou 3 horas. Os valores representam a média + erro padrão de 3 experimentos feitos em triplicata. *** indica médias diferentes do controle (A) ou veículo (B); $p < 0,001$ (ANOVA de uma via seguido do teste de Duncan).

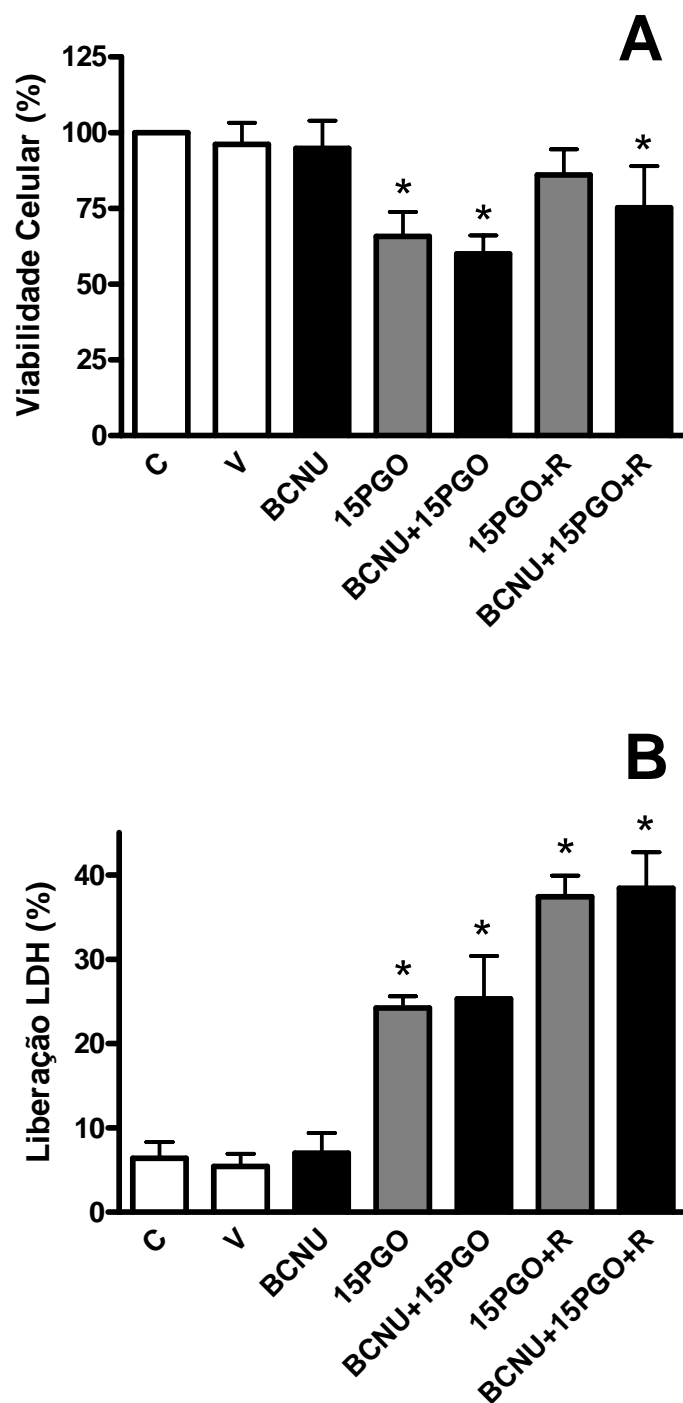


Figura 16. Avaliação da viabilidade (A) e da permeabilidade (B) celular em fatias de hipocampo de ratos na presença de carmustina e submetidas a 15 minutos de PGO. As fatias foram pré-incubadas por 30 minutos somente com o tampão fisiológico (C), com etanol 0,25 %, veículo do BCNU (V), ou com carmustina (BCNU) e submetidas a 15 minutos de PGO (15PGO), seguido de 2 horas de reperusão na ausência (15PGO+R) ou na presença (BCNU+15PGO+R) de carmustina. A avaliação da viabilidade e da permeabilidade celular foi realizada conforme descrito nos Materiais e Métodos. Os valores representam a média + desvio padrão de 3 experimentos cada em triplicatas. * indica médias diferentes do veículo; $p < 0,05$ (ANOVA de uma via seguido do teste de Duncan).

A incubação das fatias de hipocampo com ZnCl_2 1, 10 ou 100 μM , por 1 ou 3 horas, não produziu nenhum efeito sobre a atividade das enzimas GPx e GST (Figura 17) ou GGT e G6PDH (Figura 18). O ZnCl_2 apresentou uma tendência à redução da atividade GST e G6PDH, entretanto esta tendência não foi estatisticamente significativa. O BCNU mostrou uma tendência à redução na atividade de todas as enzimas testadas, entretanto esta tendência somente foi confirmada para a G6PDH, cuja inibição chegou a 40 % (Figura 18D). Havendo possibilidade, seria interessante uma ampliação no número amostral para se testar se estas tendências à inibição da atividade das enzimas são devidas à variabilidade experimental ou são realmente causadas pelos agentes testados.

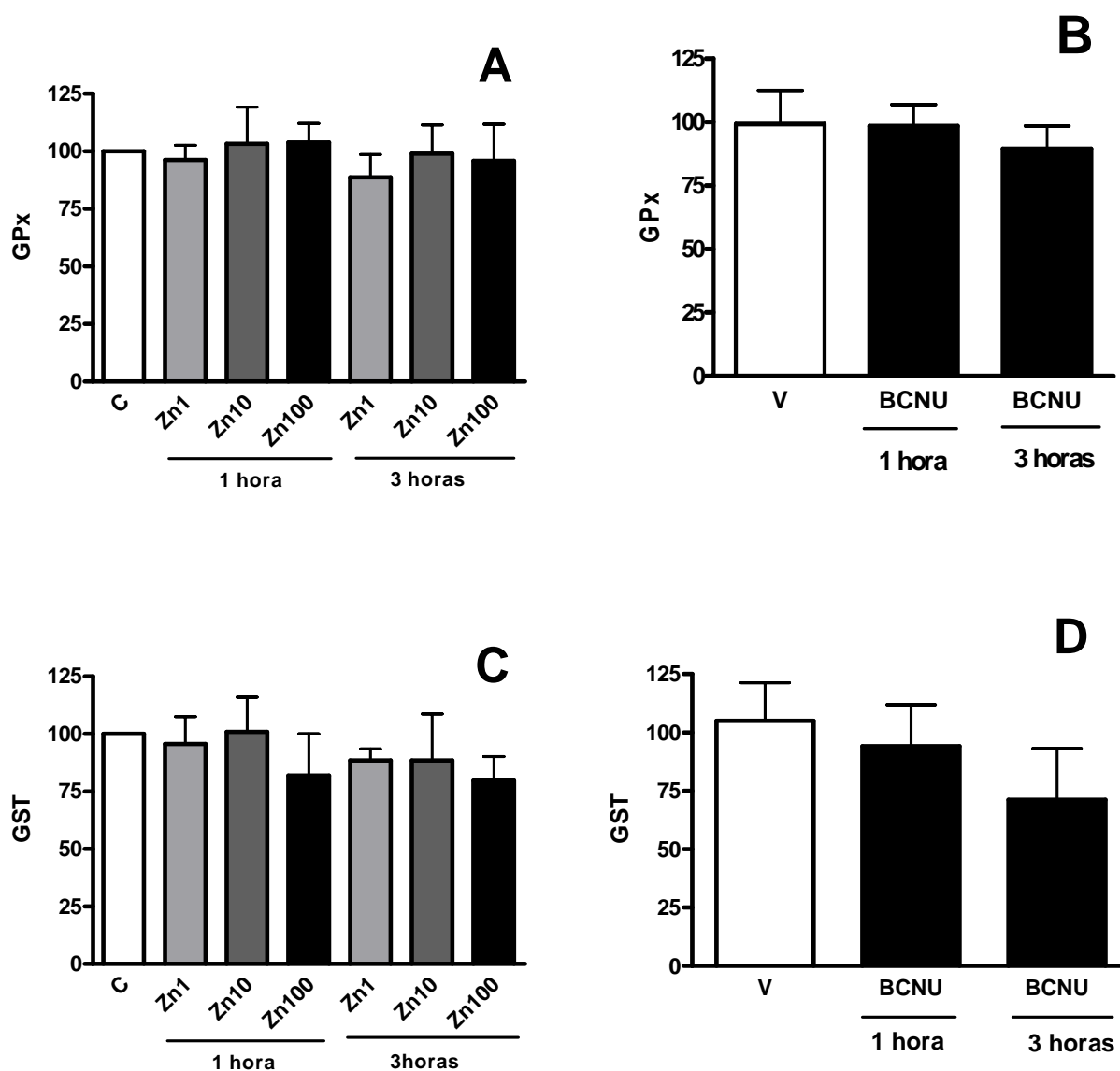


Figura 17. Ação do ZnCl_2 ou BCN sobre a atividade das enzimas glutathiona peroxidase e glutathiona S-transferase em fatias de hipocampo de ratos. . Fatias de hipocampo foram incubadas na situação controle (C), ou com ZnCl_2 (A e C) em três diferentes concentrações (1, 10 e 100 μM) por 1 e 3 horas; No tratamento com carmustina (BCNU) (B e D) as fatias incubadas com veículo etanol (V) e com BCNU 200 μM por 1 e 3 horas. Os valores representam a média + erro padrão de 3 experimentos feitos em triplicata. $p < 0,05$ (ANOVA de uma via seguido do teste de Duncan).

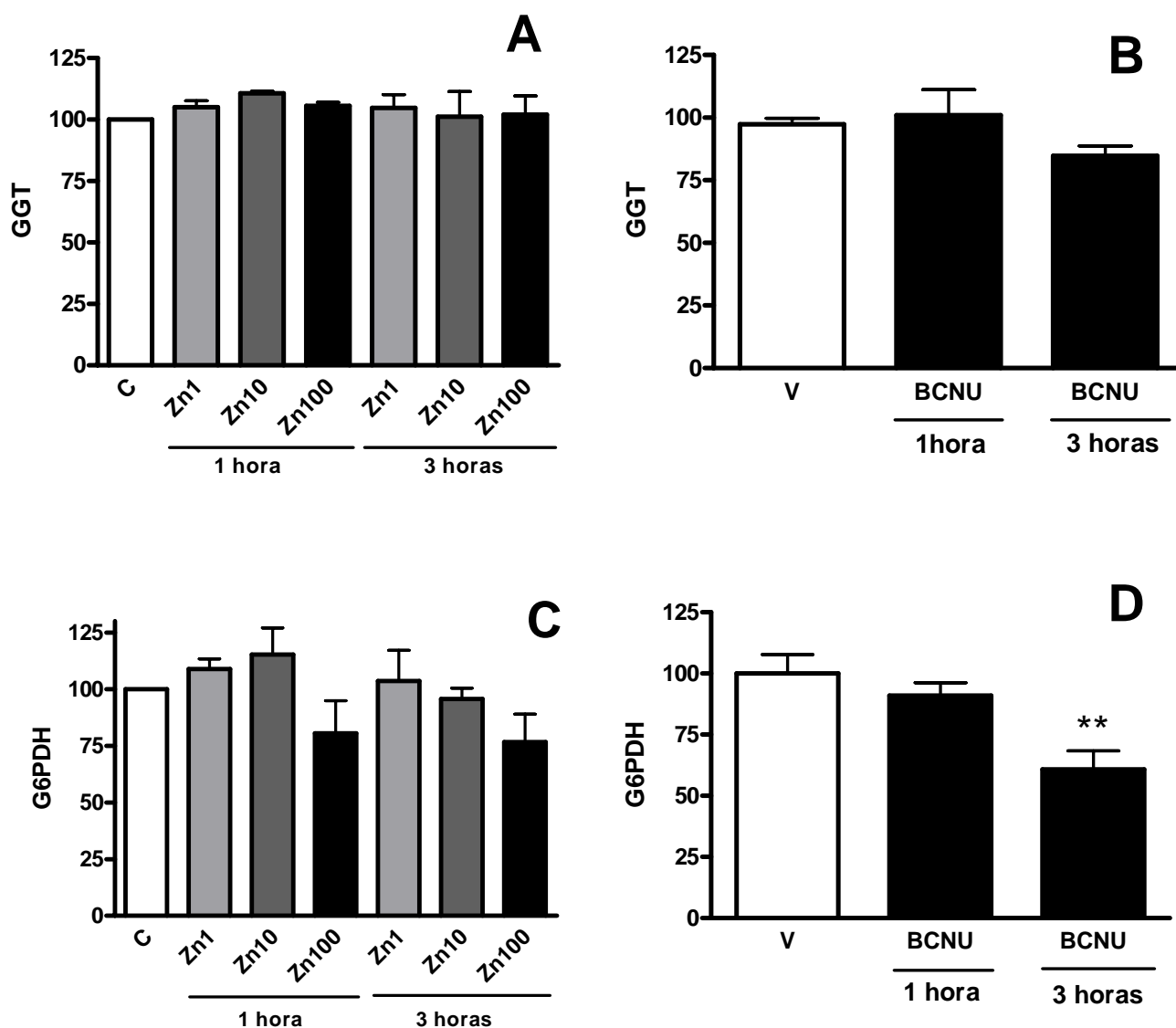


Figura 18. Ação do ZnCl₂ ou BCNU sobre a atividade das enzimas γ -glutamyl transpeptidase (GGT) e glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) em fatias de hipocampo de ratos. Fatias de hipocampo foram incubadas na situação controle (C), ou com ZnCl₂ (**A e C**) em três diferentes concentrações (Zn 1, 10 e 100 μM) por 1 e 3 horas; No tratamento com carmustina (BCNU) (**B e D**) as atias incubadas com veículo etanol (V) e com BCNU 200 μM por 1 e 3 horas. Os valores representam a média + erro padrão de 3 experimentos feitos em triplicata. ** $p < 0,005$ em relação ao grupo veículo (V) (ANOVA de uma via seguido do teste de Duncan).

4.4. Efeito do tratamento *in vitro* com quercetina e o modelo de isquemia *in vitro*

Um outro composto utilizado para verificar neuroproteção no modelo de isquemia por privação de glicose e oxigênio em fatias hipocâmpais foi a quercetina. Como já descrito nos materiais e métodos, as fatias de hipocampo de ratos adultos foram submetidas a um tratamento prévio *in vitro*, com quatro diferentes concentrações de quercetina, e posteriormente submetidas ao mesmo modelo de isquemia *in vitro* anteriormente analisado.

A viabilidade celular das fatias expostas à PGO, na ausência ou na presença de quercetina (Figura 19), diminuiu significativamente em relação ao grupo controle nos grupos submetidos a 15 minutos de PGO e no grupo tratado com quercetina 3 e 100 μM , indicando que a morte celular provocada pela isquemia não foi revertida com 3 e 100 μM de quercetina. Já nos grupos onde foi administrado quercetina a 10 e 30 μM , nas fatias submetidas a 15 minutos de PGO, pode-se observar um efeito neuroprotetor desta, com valores de viabilidade celular semelhantes ao grupo controle. Foi observado, também, que nos grupos de 15 minutos de PGO associado a 2 horas de reperfusão houve um aumento significativo da viabilidade celular em comparação ao grupo de PGO 15 minutos, podendo indicar que durante a reperfusão exista uma melhora da viabilidade observada no grupo 15PGO+R e que quando associada ao tratamento com quercetina esta melhora pode ser ainda mais acentuada, principalmente na dose de 10 μM .

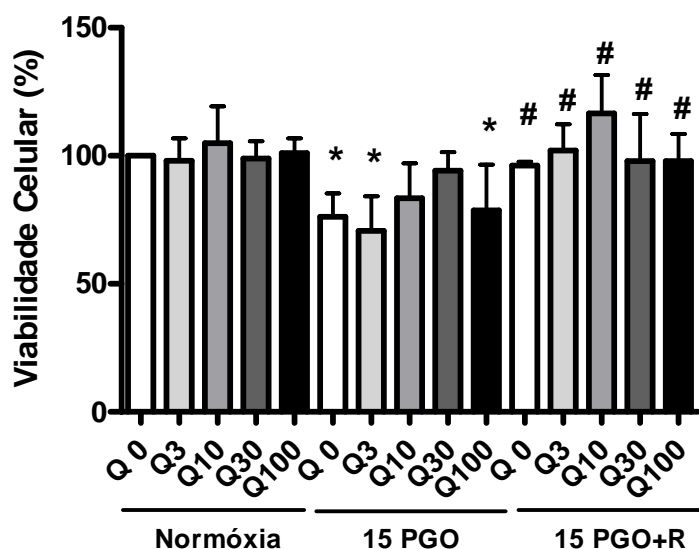


Figura 19. Avaliação da viabilidade celular em fatias de hipocampo de ratos submetidas a 15 minutos de PGO no tratamento *in vitro* com quercetina. Fatias incubadas na situação controle (Normóxia), tratadas na ausência (Q0) ou na presença de diferentes concentrações de quercetina 3, 10, 30 e 100 μ M (Q3, Q10, Q30 e Q100, respectivamente). As fatias de hipocampo foram submetidas a 15 minutos de PGO (15PGO), e 15 minutos de PGO seguidos de 2 horas de reperfusão (15PGO+R). A avaliação da viabilidade celular foi realizada conforme descrito nos Materiais e Métodos. Os valores representam a média + desvio padrão de 4 experimentos feitos em triplicata. * indica diferenças significativas do grupo Normóxia Q0; # indica diferenças significativas do grupo Q0 para a condição de 15PGO. $p < 0,05$ (ANOVA de uma via seguido do teste de Duncan).

Este padrão de neuroproteção foi confirmado quando a permeabilidade celular foi analisada através da liberação de LDH. Após 15 minutos de isquemia houve um grande aumento na liberação de LDH (Figura 20). Nos grupos pré-tratados com quercetina 3, 30 e 100 μ M observa-se uma tendência para redução desta liberação, o que foi significativo apenas na concentração de 10 μ M. A neuroproteção causada pela quercetina 10 μ M foi completa no grupo 15PGO, uma vez que a liberação de LDH não diferiu da liberação do grupo controle. No grupo de 15PGO+R a permeabilidade celular aumentou ainda mais na ausência de quercetina, sendo que a quercetina nas concentrações de 3, 10 e 30 μ M atenuou esta liberação, sendo mais efetiva na concentração de 10 μ M. Na reperfusão a quercetina, nas concentrações 3, 10 e 30 μ M,

produziu uma liberação de LDH menor que durante o período de 15 minutos de PGO, demonstrando assim, uma forte ação neuroprotetora.

Com os dados obtidos através da análise de viabilidade e permeabilidade celular pode-se dizer que a quercetina teve ação neuroprotetora em fatias de hipocampo de ratos submetidas à privação de glicose e oxigênio, e que esta proteção foi dependente da concentração utilizada, onde a menor e a maior concentração de quercetina não ofereceram proteção. Houve uma forte correlação inversa entre os valores de viabilidade (redução do MTT) e a permeabilidade celular (liberação da LDH) tanto no período isquêmico (15PGO), quanto no período de reperfusão, confirmando o efeito neuroprotetor da quercetina nestas duas condições (Figura 21).

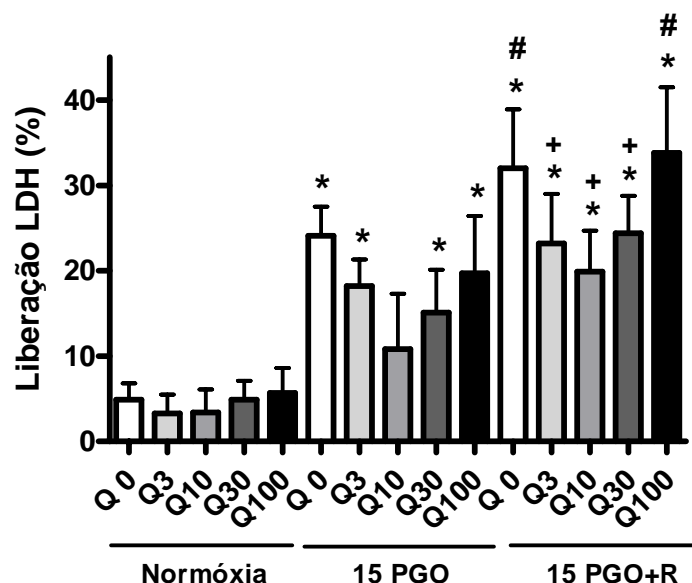


Figura 20. Avaliação da permeabilidade celular em fatias de hipocampo de ratos submetidas a 15 minutos de PGO no tratamento *in vitro* com quercetina. Legenda como apresentado na Figura 19. A avaliação da permeabilidade celular foi realizada conforme descrito nos Materiais e Métodos. Os valores representam média + desvio padrão de 4 experimentos feitos em triplicatas. * indica diferenças significativas do grupo Normóxia Q0; # indica diferenças significativas de Q0 para a condição de 15PGO; + indica diferenças significativas para a condição de 15PGO+R. $p < 0,05$ (ANOVA de uma via seguido do teste de Duncan).

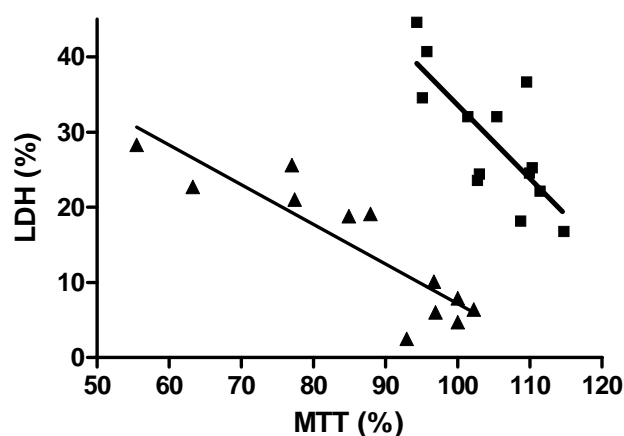


Figura 21. Correlação entre a permeabilidade (liberação de LDH) e viabilidade (redução do MTT) celular em fatias de hipocampo de ratos submetidas a 15 minutos de PGO no tratamento *in vitro* com quercetina. Dados individuais de dois experimentos nos quais as duas variáveis foram medidas de uma mesma preparação. Os dados obtidos no período isquêmico (triângulos) ou no período de reperusão (quadrados) estão apresentados no gráfico. O coeficiente de correlação foi significativo, tanto para o período de isquemia ($r = 0.89$, $p < 0.0001$), quanto para o período de reperusão ($r = 0.76$; $p < 0.002$).

Quando o conteúdo de GSH-t foi avaliado (Figura 22) em fatias de hipocampo de ratos submetidas a PGO, não foram observados diferenças significativas nas fatias submetidas à 15 minutos de PGO, com ou sem quercetina, em relação ao grupo controle. Entretanto, quando observado o grupo de 15PGO+R, viu-se uma redução significativa do conteúdo de GSH-t tanto no grupo sem quercetina quanto nos grupos com quercetina. Esta queda dos níveis de GSH-t, no período de reperfusão, não foi protegida pela quercetina.

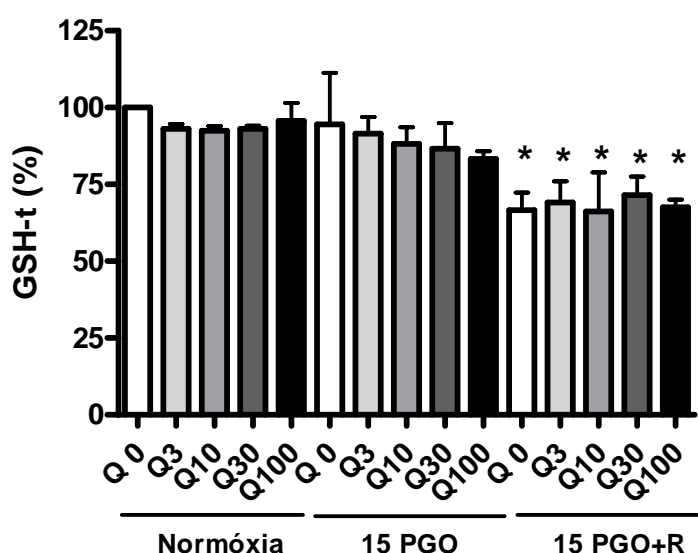


Figura 22. Determinação do conteúdo de GSH-t em fatias de hipocampo de ratos submetidas a 15 minutos de PGO no tratamento *in vitro* com quercetina. Legenda como apresentado na Figura 19. A determinação do conteúdo de GSH-t foi realizada conforme descrito nos Materiais e Métodos. Os valores representam média + desvio padrão de 4 experimentos feitos em triplicata. * indica diferenças significativas do grupo Normóxia Q0. $p < 0,05$ (ANOVA de uma via seguido do teste de Duncan).

O conteúdo dos tióis protéicos (Figura 23) analisados neste modelo de isquemia *in vitro*, na ausência ou na presença de quatro diferentes concentrações de quercetina (3, 10, 30 e 100 μM), não apresentou diferenças significativas dos grupos 15PGO e

15PGO+R em relação ao grupo controle. Foi apenas observado uma diminuição do conteúdo de PSH no grupo 15PGO+R com quercetina a 100 μ M, em relação ao grupo de 15PGO. Quando associado ao período de reperfusão, a quercetina produziu uma tendência em acentuar o estresse oxidativo quando empregada na concentração mais elevada.

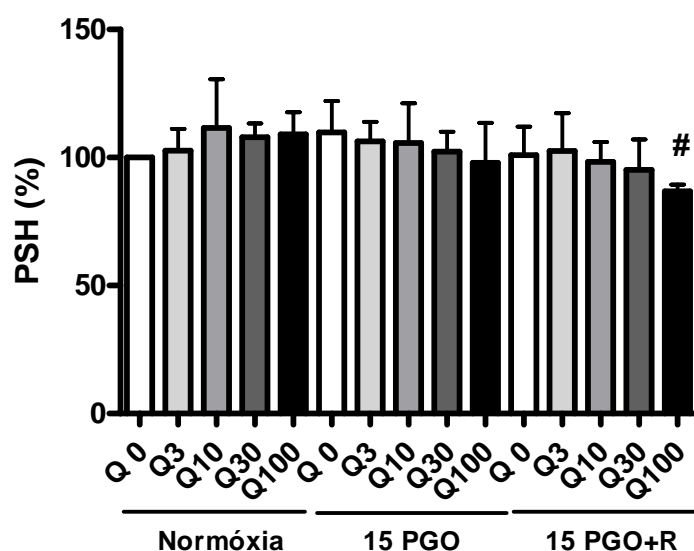


Figura 23. Determinação do conteúdo dos PSH em fatias de hipocampo de ratos submetidas a 15 minutos de PGO no tratamento *in vitro* com quercetina. Legenda como apresentado na Figura 19. A determinação do conteúdo dos PSH foi realizada conforme descrito nos Materiais e Métodos. Os valores representam média + desvio padrão de 4 experimentos feitos em triplicata. # indica diferenças significativas de Q0 para a condição de 15PGO. $p < 0,05$ (ANOVA de uma via seguido do teste de Duncan).

4.5. Efeito do tratamento *in vitro* com quercetina e o modelo de estresse oxidativo

A ação do flavonóide quercetina também foi avaliada através de um modelo de estresse oxidativo na tentativa de analisar sua capacidade antioxidante, já bem descrita

na literatura, mas ainda não investigado em fatias de hipocampo de ratos. As fatias foram expostas ao H_2O_2 em três concentrações diferentes. Essas mesmas fatias foram previamente tratadas com quatro diferentes concentrações de quercetina (3, 10, 30 e 100 μM) e posteriormente expostas ou não ao H_2O_2 .

No teste do MTT não foi observada redução da viabilidade quando administrado 0,25 mM de H_2O_2 associado a quercetina em suas diferentes concentrações (Figura 24). Já quando foi administrado H_2O_2 1,0 mM houve uma redução da viabilidade. Esta redução não foi alterada nos grupos que foram tratados com quercetina nas concentrações de 3, 30 e 100 μM . O grupo tratado com 10 μM de quercetina, submetida ao H_2O_2 , teve uma reversão parcial da viabilidade, não mais diferindo do grupo controle, indicando uma tendência de neuroproteção pela quercetina (Figura 24). O tratamento com H_2O_2 2,5 mM também promoveu a redução na viabilidade celular, e a quercetina nas concentrações de 3 e 10 μM não alteraram esta resposta, já nas concentrações de 30 e 100 μM houve uma reversão da neurotoxicidade causada pela H_2O_2 2,5 mM, uma vez que nestas concentrações a redução do MTT foi similar ao grupo controle (Figura 24).

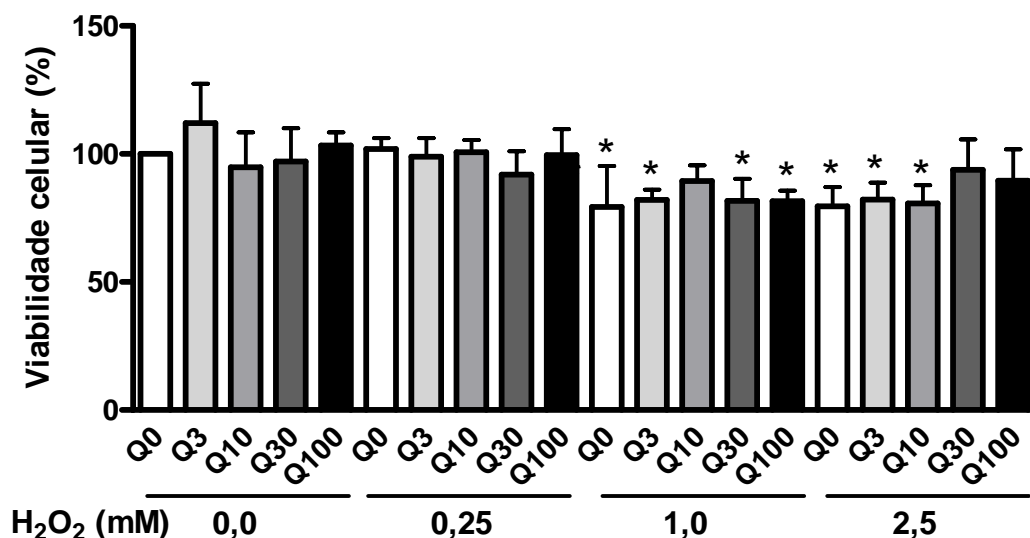


Figura 24. Avaliação da viabilidade celular em fatias de hipocampo de ratos submetidas a H₂O₂ no tratamento *in vitro* com quercetina. Fatias incubadas na situação controle tratadas na ausência (Q0) ou na presença de diferentes concentrações de quercetina 3, 10, 30 e 100 μM (Q3, Q10, Q30 e Q100, respectivamente). As fatias de hipocampo tratadas com quercetina foram submetidas ao tratamento com H₂O₂ nas concentrações 0,25, 1,0 e 2,5 mM durante 90 minutos. A avaliação da viabilidade celular foi realizada conforme descrito nos Materiais e Métodos. Os valores representam a média + desvio padrão de 4 experimentos feitos em triplicata. * indica diferenças significativas do grupo controle (Q0). $p < 0,05$ (ANOVA de uma via seguido do teste de Duncan).

O conteúdo de GSH-t, no modelo de estresse oxidativo expondo fatias de hipocampo de ratos ao H₂O₂, pode ser observado na Figura 25, evidenciando que no grupo tratado com H₂O₂ 0,25 mM e com quercetina em suas diferentes concentrações, não houve diferença significativa. Na concentração de H₂O₂ 1,0 e 2,5 mM houve uma redução significativa do conteúdo de GSH-t em todos os grupos analisados em relação ao grupo controle. A quercetina não foi capaz de alterar esta resposta, demonstrando que este flavonóide não impede a redução nos níveis de GSH-t. Entretanto, ainda não se descarta a possibilidade da quercetina atuar como sequestrador de ERO.

O conteúdo de PSH não apresentou alterações significativas por nenhum dos tratamentos empregados (Figura 26).

Para permitir uma comparação dos resultados obtidos a tabela 5 foi compilada.

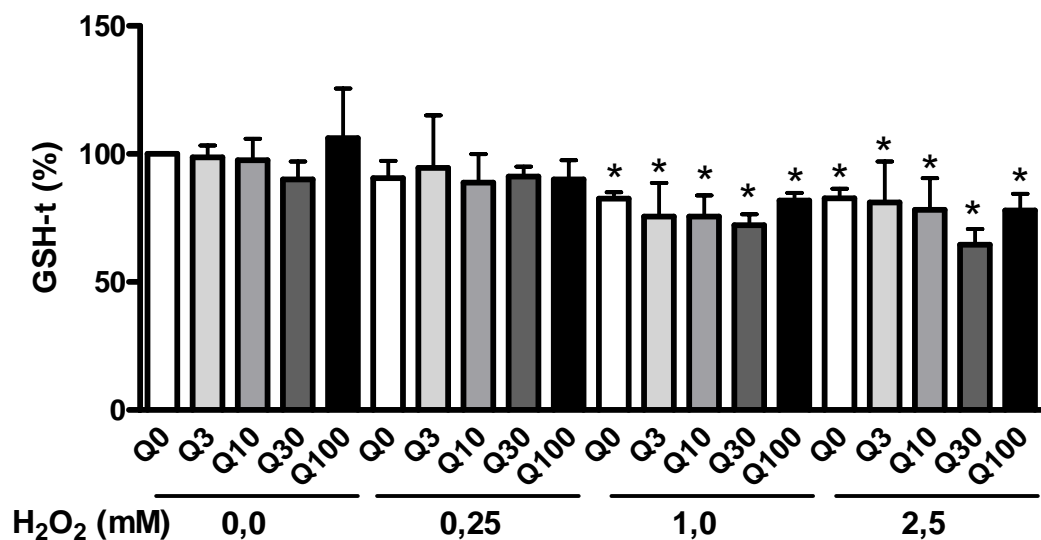


Figura 25. Determinação do conteúdo de GSH-t em fatias de hipocampo de ratos submetidas a H₂O₂ a 0,25, 1,0 e 2,5 mM no tratamento *in vitro* com quercetina. Legenda como apresentado na Figura 24. A determinação do conteúdo de GSH-t foi realizada conforme descrito nos Materiais e Métodos. Os valores representam média + desvio padrão de 4 experimentos feitos em triplicata. * indica diferenças significativas do grupo controle (Q0). p < 0,05 (ANOVA de uma via seguido do teste de Duncan).

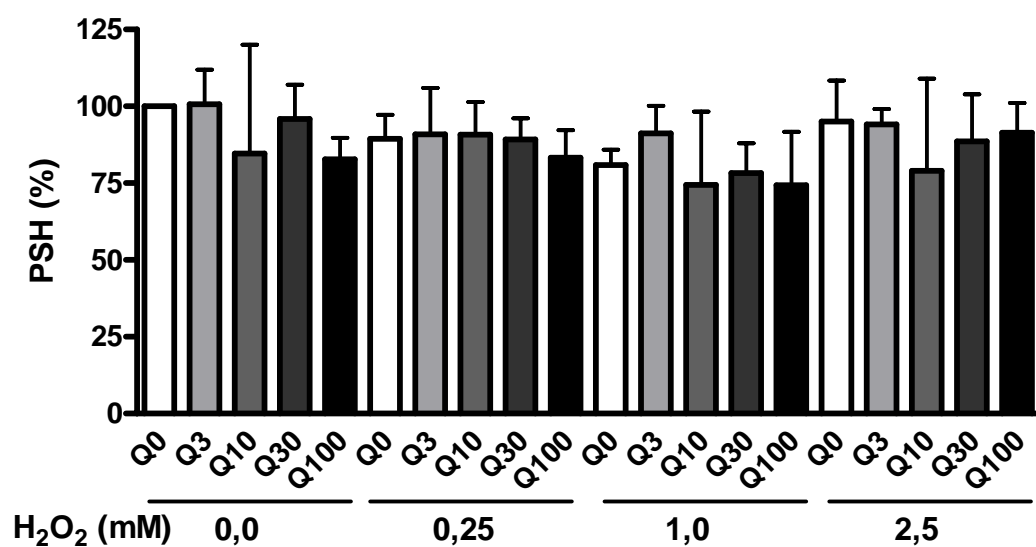


Figura 26. Determinação do conteúdo de PSH em fatias de hipocampo de ratos submetidas a H₂O₂ a 0,25, 1,0 e 2,5 mM no tratamento *in vitro* com quercetina. Legenda como apresentado na Figura 24. A determinação do conteúdo de PSH foi realizada conforme descrito nos Materiais e Métodos. Os valores representam média + desvio padrão de 4 experimentos feitos em triplicatas. p < 0,05 (ANOVA de uma via seguido do teste de Duncan).

Tabela 5: Resumo dos resultados obtidos:

Tratamentos	Viabilidade Celular (%)	Permeabilidade Celular (%)	Conteúdo de GSH (%)	Conteúdo de PSH (%)
<i>com Zn²⁺ e modelo de isquemia ex vivo</i>	Redução na isquemia de 15' e 60', mantida na reperfusão. O tratamento <i>in vivo</i> não altera a resposta.	Elevação nos grupos de 15' e 60' de isquemia com maior aumento na reperfusão. O tratamento não altera a resposta.	Redução na reperfusão após 60' de isquemia. O tratamento não altera a resposta.	Sem alteração.
<i>com Zn²⁺ e modelo de isquemia in vitro</i>	Tendência a neuroproteção (Zn 10 e 100 µM) na reperfusão após 15' PGO. Neurotoxicidade com Zn 100 µM na isquemia de 60' e na reperfusão após 60' PGO.	Tendência a neuroproteção com Zn 100 µM na reperfusão após 15' ou 60' de PGO.	Níveis reduzidos na reperfusão após 15' ou 60' de PGO. Tendência a maior efeito (neurotoxicidade) com 100µM Zn.	Reduz com Zn 10 e 100 µM na reperfusão após 15' ou 60' de PGO.
<i>com quercetina e o modelo de isquemia (15') in vitro</i>	Neuroproteção com Q 10 e 30 µM na isquemia. Não altera a resposta na reperfusão.	Neuroproteção com Q 10 µM na isquemia e com Q 3, 10 e 30 µM na reperfusão.	A redução na reperfusão não é alterado pela Q.	Reduz na reperfusão com Q 100 µM.
<i>com quercetina e o modelo de estresse oxidativo</i>	Tendência a neuroproteção em Q 10 µM em H ₂ O ₂ 1,0 mM e Q 30 e 100 µM em H ₂ O ₂ 2,5 mM.	Não determinado.	Redução por H ₂ O ₂ 1,0 e 2,5mM. Q não altera a resposta.	Sem alteração.

5. DISCUSSÃO

5.1. Considerações gerais

O presente trabalho foi motivado pela necessidade de se avaliar a ação neurotóxica ou neuroprotetora do ZnCl_2 . Para esta finalidade, escolhemos dois tipos de insulto, o modelo de isquemia e o modelo de estresse oxidativo *in vitro*. Baseado em estudos prévios do grupo optou-se, em um primeiro momento, em se estudar o potencial neuroprotetor da administração de Zn^{2+} *in vivo*, seguido do modelo de isquemia *in vitro*. A administração de agentes neuroprotetores *in vivo* e posterior teste *in vitro* é um protocolo interessante para se evitar efeitos sistêmicos e a interferência de mediadores locais. Entretanto, os resultados indicaram que o tratamento com ZnCl_2 *in vivo* não foi efetivo na proteção contra as alterações causadas no modelo de isquemia, então passamos a estudar o efeito da administração de ZnCl_2 *in vitro*.

A utilização de fatias de hipocampo foi determinada por ser o hipocampo, uma das áreas mais susceptíveis à danos celulares decorrente de processos isquêmicos. Além disto, estudos *in vitro* oferecem a possibilidade de se testar os efeitos diretos de compostos de interesse. Entretanto, a ação destes agentes deve ser efetiva dentro de uma janela de tempo muito pequena, 1-3 horas, o que é uma limitação do modelo, pois não permite a observação de efeitos mais tardios, tais como remodelagem ou morte celular. Por outro lado, a limitação das respostas adaptativas permite identificar a situação atual do tecido. A utilização de um protocolo que permite a incubação das fatias hipocampais por um período mais prolongado (6 horas), desenvolvida por nosso grupo de pesquisa (Molz *et al.*, 2008), poderá contribuir para o entendimento de respostas de neuroproteção e/ou neurotoxicidade mais tardias.

O Zn^{2+} , um elemento essencial para a estrutura e função regulatória e/ou enzimática de diversas proteínas, está presente em abundância no SNC, mais especificamente em neurônios glutamatérgicos, podendo ser liberado conjuntamente com este. Já está claro que durante processos isquêmicos, conjuntamente com a liberação de glutamato, o Zn^{2+} pode contribuir para danos celulares, mas também existem vários estudos que descrevem o Zn^{2+} como tendo um papel neuroprotetor (Galasso e Dyck, 2007). A ação do Zn^{2+} depende das diferentes situações e de quais regiões do cérebro são estudadas, existindo uma diversidade de estudos quanto aos modelos utilizados (Suh *et al.*, 2000a, b; Shabanzadeh *et al.*, 2004; Hellmich *et al.*, 2004), a duração da isquemia (Matsushita *et al.*, 1996), dosagem, o uso de quelantes de Zn^{2+} (Hellmich *et al.*, 2004; Calderone *et al.*, 2004) ou bloqueadores de canais AMPA/KA permeáveis a Ca^{2+} e Zn^{2+} (Frederickson *et al.*, 2002; Yin *et al.*, 2002; Noh *et al.*, 2005). E ainda, podem-se utilizar outros compostos como o piruvato (Lee *et al.*, 2001), e outras vias como através de metalotioneínas (Campagne *et al.*, 1999; 2000; Yanagitani *et al.*, 1999), na tentativa de favorecer a neuroproteção contra a neurotoxicidade promovida pelo Zn^{2+} . Decorrente desta controvérsia objetivou-se investigar a ação do Zn^{2+} num modelo de isquemia *in vitro* tratando animais com Zn^{2+} *in vivo* ou expondo fatias de hipocampo a diferentes concentrações de Zn^{2+} *in vitro*.

Em um segundo momento, optou-se por estudar os efeitos neuroprotetores da quercetina, baseado em dados da literatura que indicam que a quercetina tem efeitos neuroprotetores *in vivo* e *in vitro*. Para esta finalidade, além do modelo de isquemia, verificou-se o papel neuroprotetor da quercetina em um modelo de estresse oxidativo, utilizando-se para isto H_2O_2 .

Em um segundo momento, optou-se por estudar os efeitos neuroprotetores da quercetina, baseado em dados da literatura que indicam que a quercetina tem efeitos

neuroprotetores *in vivo* e *in vitro*. Para esta finalidade, além do modelo de isquemia, verificou-se o papel neuroprotetor da quercetina em um modelo de estresse oxidativo, utilizando-se para isto tratamento com H_2O_2 .

5.2. Efeito do tratamento *in vivo* com $ZnCl_2$ e o modelo de isquemia *ex vivo*

O tratamento *in vivo* com $ZnCl_2$ não alterou a viabilidade nem a permeabilidade celular de fatias de hipocampo desses mesmos animais, tampouco alterou a resposta quando submetidas à PGO por 15 e 60 minutos associadas ou não a reperusão. Apesar de não evidenciarmos neuroproteção, já foi demonstrado o efeito neuroprotetor do tratamento *in vivo* com Zn^{2+} contra um organofosforado, o malation (Brocardo *et al.*, 2007). Em outros experimentos foi demonstrado que o taratamento oral com $ZnCl_2$ por 30 dias, produziu um efeito tipo antidepressivo em modelos comportamentais, bem como o aumento da expressão de BDNF, além de aumentar a ativação da ERK no córtex, mas não no hipocampo de ratos (Franco *et al.*, 2008a). O mesmo tratamento via oral também reverteu a redução na atividade de várias enzimas antioxidantes no hipocampo de ratos (Dados não publicados). Em fatias de hipocampo, apesar de produzir uma redução na viabilidade, o $ZnCl_2$ induziu um aumento na fosforilação da Akt (Borowski, 2006), geralmente considerada como uma via de neuroproteção. Em suma, o efeito neuroprotetor/neurotrófico do Zn^{2+} , observado *in vivo* não foi confirmado submetendo-se fatias de hipocampo a PGO. Esperávamos que nossos resultados com o tratamento *in vivo* com $ZnCl_2$ pudessem indicar vias de neuroproteção contra a privação de glicose e oxigênio neste modelo de isquemia *in vitro*, como observado nos estudos

citados anteriormente. Talvez esta ausência de neuroproteção esteja relacionada ao tecido estudado (hipocampo), uma vez que a indução de BDNF e ativação de ERK foram evidenciadas somente no córtex, mas não no hipocampo (Franco *et al.*, 2008a). Entretanto, o tratamento *in vivo* com ZnCl_2 protegeu contra a redução na atividade de várias enzimas antioxidantes no hipocampo (Dados não publicados). Baseado nos resultados obtidos com o uso de fatias de hipocampo podemos inferir que, as vias de neuroproteção ativadas pelo tratamento *in vivo* com ZnCl_2 não estão envolvidas primariamente com os mecanismo de neuroproteção contra a PGO.

Sabendo-se que a isquemia ocasiona a redução de tióis intracelulares (Dafre *et al.*, 2003; Brongholi *et al.*, 2006), foi então avaliado a ação do tratamento *in vivo* com ZnCl_2 sobre os níveis de glutathiona total (GSH-t) e de tióis protéicos (PSH). Os níveis de GSH-t foram reduzidos por 60 minutos de PGO e 2 horas de reperusão, tanto nas fatias de animais controle como tratados com ZnCl_2 . Houve apenas, redução significativa do conteúdo de GSH-t quando fatias de hipocampo de animais tratados com ZnCl_2 foram submetidas a 15 minutos de PGO e 2 horas de reperusão. Estes resultados indicam, desta maneira, que o estresse oxidativo promovido pela isquemia/reperusão pode estar acentuado pela presença do ZnCl_2 . De qualquer forma este efeito é tênue e precisa ser melhor investigado. Vários estudos descrevem que o estresse oxidativo pode desencadear estresse nitrosilativo e que, quando associados ao Zn^{2+} , podem acentuar a morte de células neuronais em situações de isquemia e/ou doenças neurodegenerativas, diminuindo a concentração de Zn^{2+} intracelular em neurônios pré-sinápticos, mas aumentando sua concentração no meio extracelular, contribuindo para neurotoxicidade de neurônios pós-sinápticos (Cuajungo e Lees, 1998; Lee *et al.*, 2000; 2002b; Frederickson *et al.*, 2002; Wei *et al.*, 2004). Baseado nos dados obtidos percebe-se que o tratamento *in vivo* com ZnCl_2 não oferece neuroproteção

contra PGO, e ao contrário, apresenta indícios de neurotoxicidade quando os tióis são os parâmetros estudados.

5.3. Efeito do tratamento *in vitro* com ZnCl_2 e o modelo de isquemia *in vitro*

A partir destes resultados, passamos então a testar se o Zn^{2+} tem papel neurotóxico expondo fatias de hipocampo a diferentes concentrações de ZnCl_2 e ao modelo de isquemia, ambas as exposições realizadas *in vitro*. Em trabalho anterior (Borowski, 2006), foi demonstrado que o ZnCl_2 é capaz de reduzir a viabilidade celular de fatias de hipocampo de animais jovens, indicando sua neurotoxicidade, entretanto, algumas vias de sinalização envolvidas com a sobrevivência celular também foram ativadas pelo ZnCl_2 . Por outro lado, no estudo de Oliveira (2006), o ZnCl_2 também ativou vias de sinalização de sobrevivência celular através da ERK, bem como promoveu a fosforilação de vias pró-apoptóticas como a JNK e p38^{MAPK} . Os resultados obtidos pela avaliação da viabilidade e permeabilidade celular no tratamento *in vitro* com três diferentes concentrações de ZnCl_2 demonstraram que este tem efeito dual. O ZnCl_2 10 e 100 μM apresenta uma tendência a neuroproteção sobre a viabilidade no período de reperfusão, quando as fatias são submetidas a 15 minutos de PGO. Porém, após 60 minutos de PGO a concentração de 100 μM provocou uma maior redução na viabilidade, o mesmo efeito observado no período de reperfusão após 60 minutos de PGO. Quando se analisa a permeabilidade celular, o tratamento com 100 μM ZnCl_2 teve um leve efeito neuroprotetor no período de reperfusão, tanto após 15, como após 60 minutos de PGO. Por outro lado, os níveis de PSH foram reduzidos no período de

reperfusão após 15 e 60 minutos de PGO, mas somente em fatias tratadas com ZnCl_2 (10 e 100 μM). Sendo que em ambos os parâmetros (viabilidade/permeabilidade) houve resultados opostos, além de uma maior redução de tióis, pode-se concluir que o tratamento com ZnCl_2 produz um efeito dual sobre privação de glicose e oxigênio. Desta forma, alguns parâmetros apontam para neuroproteção e outros para neurotoxicidade. Este efeito duplo do Zn^{2+} também foi descrito por Côté *et al.* (2005) e Borowski (2006), o que remete para mecanismos de regulação da sua concentração intracelular, como também de tipos específicos de células e/ou modelo utilizado.

Diversas vias de neurotoxicidade potenciais são dependentes de síntese protéica e/ou remodelagem celular, fenômenos que dificilmente serão observados neste modelo de incubação de fatias hipocâmpais. Entretanto, várias vias de neurotoxicidade podem ser evocadas pelo Zn^{2+} neste modelo, tais como: 1. Através da translocação de Zn^{2+} das vesículas pré-sinápticas para a fenda sináptica e daí ser transportado para neurônios pós-sinápticos através de receptores de Glu permeáveis a cátions (Tsuda *et al.*, 1997); 2. Pelo aumento da sobrecarga de Ca^{2+} intracelular devido ao aumento de Zn^{2+} intracelular também contribuindo para excitotoxicidade (Stork e Li, 2006), o que pode levar a acidose intracelular e aumento na ativação de receptores AMPA e consequentemente potencializam a mobilização do Zn^{2+} intracelular (Dineley *et al.*, 2002; Yin *et al.*, 2002; Noh *et al.*, 2005; Sensi *et al.*, 2006; Franzini *et al.*, 2007); 4. Por depleção de ATP que, associada ao acúmulo de Zn^{2+} intracelular, pode levar ao aumento da permeabilidade das membranas celulares, inclusive da membrana mitocondrial, podendo resultar na liberação de citocromo C, ativação de caspases e danos ao DNA - evocados pela ativação da PARP-1 levando a depleção de NAD^+ (Lee *et al.*, 2002a; Calderone *et al.*, 2004; Bonanni *et al.*, 2006; Cai *et al.*, 2006; Won *et al.*, 2007); 5. Pela diminuição da capacidade da captação de Glu pelos astrócitos contribuindo dessa maneira, para o

prejuízo na proteção dos neurônios pelos astrócitos (Won *et al.*, 2007); 6. Pelo aumento de metalotioneínas como a MT-3 e MT-1 (Yanagitani *et al.*, 1999); 7. E ainda, pelo aumento da atividade da proteína quinase C (PKC) envolvida na sinalização celular, e pela geração de radicais livres, induzida pelo aumento do Zn^{2+} intracelular (Noh *et al.*, 1999).

A depleção dos níveis de GSH-t e potenciação na redução nos níveis de PSH, observadas quando as fatias de hipocampo de ratos foram submetidas a 15 e 60 minutos de PGO e 2 horas de reperfusão, podem indicar que o estresse oxidativo provocado pela situação de isquemia *in vitro* foi acentuado pela presença de $ZnCl_2$, podendo estar associado ao estresse nitrosativo, já comentado anteriormente. Essa redução dos níveis de GSH-t em fatias de hipocampo submetidas ao modelo de isquemia *in vitro* já havia sido observada no estudo de Brongholi *et al.* (2006). Como esta redução tinha sido observada apenas quando as fatias são submetidas a 60 minutos de PGO seguidas de 1 ou 2 horas de reperfusão, a redução da GSH-t induzida por Zn^{2+} nas fatias submetidas a 15 minutos de PGO e 2 horas de reperfusão, indica uma ação citotóxica do Zn^{2+} .

5.4. Inibição da glutathiona redutase como via responsável pela ação citotóxica do $ZnCl_2$

Para observar como o Zn^{2+} poderia estar agindo toxicamente sobre as fatias de hipocampo, avaliamos a hipótese de que a redução da atividade da enzima glutathiona redutase (GR), pudesse estar envolvida. Esta hipótese baseia-se no fato que o Zn^{2+} é um potente inibidor da GR *in vitro* (Mize e Langdon, 1962), e *in vivo* em ratos (Brocardo *et al.*, 2005; Franco *et al.*, 2008a), em peixes (Franco *et al.*, 2008b) e em mexilhões

(Franco *et al.*, 2006). Como a GR é uma importante defesa antioxidante, uma vez que evita o acúmulo de GSSG, que é bastante tóxico (Kosower e Kosower, 1978). Para confirmar que a inibição da GR é um fenômeno relevante, as fatias de hipocampo também foram tratadas com seu inibidor específico, o BCNU. Tanto o Zn^{2+} , como BCNU, inibiram fortemente a atividade GR. Para testar a especificidade da inibição sobre a GR, outras enzimas foram avaliadas (GPx, GST, GGT e G6PDH). O Zn^{2+} não alterou a atividade de nenhuma outra enzima testada, entretanto, o BCNU produziu uma redução significativa na atividade G6PDH. Deste modo, a inibição da enzima G6PDH, que fornece NADPH, seria uma via adicional de toxicidade para o BCNU.

Contrário às nossas expectativas, ao se testar a condição celular, esta hipótese não pode ser confirmada. O Zn^{2+} produziu efeitos duais, como descritos anteriormente, e o BCNU também não alterou a resposta isquêmica quando aos parâmetros redução de MTT e liberação de LDH foram determinados. Baseado nestes dados podemos concluir que a atividade GR não é um fator crucial para determinar a viabilidade ou a permeabilidade celular no modelo de isquemia. Estes dados concordam com os obtidos recentemente com cultura de astrócitos, em que o estresse oxidativo causado pelo Zn^{+2} envolve outros mecanismos que não a inibição da enzima GR (Bishop *et al.*, 2007).

5.5. O papel neuroprotetor da quercetina no modelo de isquemia *in vitro*

Como um dos focos principais do trabalho foi buscar agentes neuroprotetores, optamos por testar um agente que sabidamente tem efeito antioxidante e que também já foi demonstrado efeito neuroprotetor em modelos *in vivo* e *in vitro*. Desta forma, a ação

do flavonóide quercetina foi testada no modelo de isquemia *in vitro* em fatias de hipocampo de ratos adultos.

Conforme observado nos resultados obtidos, pode-se notar a ação neuroprotetora da quercetina no modelo de isquemia *in vitro*. A quercetina impediu a redução de viabilidade celular e o aumento na liberação da LDH. As concentrações intermediárias foram as mais efetivas, indicando que 3 μM é uma concentração limite para o efeito neuroprotetor, mas também indica que 100 μM pode ser uma concentração de quercetina que ativa outras vias, perdendo seu poder neuroprotetor. Além disto, houve uma forte correlação entre a liberação de LDH e a redução de MTT, indicando que a curva de proteção em forma de “U” é um resultado consistente.

Várias vias de neuroproteção podem ser usadas para explicar o efeito neuroprotetor da quercetina no modelo de isquemia. Entre estas está a capacidade antioxidante da quercetina, promovendo a eliminação de ERO e de espécies reativas de nitrogênio (ERN) (Moskaug *et al.*, 2004). Entretanto, apesar do potencial tóxico da quercetina estar pobremente descrito na literatura, em humanos a ingestão de quercetina parece favorecer os efeitos benéficos, sendo comercializada como suplemento alimentar (Okamoto, 2005). A quercetina tem efeito neuroprotetor *in vivo* contra os insultos causados pela isquemia (Cho *et al.*, 2006; Pu *et al.*, 2007). Em cultura de células corticais, a quercetina apresenta efeito neuroprotetor contra a ação de agonistas de receptores glutamatérgicos (NMDA e cainato), além de ter ação protetora contra insulto isquêmico (Ha *et al.*, 2003). Sabendo-se que durante os processos isquêmicos ocorre excitotoxicidade glutamatérgica, com influxo de Ca^{2+} , ocasionando um aumento da produção de ERO como também um aumento da produção de ERN agravando a morte celular (Shutenko *et al.*, 1999; White *et al.*, 2000; Dajas *et al.*, 2003), é possível que a ação da quercetina envolva estes mecanismos.

A quercetina também poderia levar a neuroproteção por proporcionar a manutenção da atividade de enzimas antioxidantes como SOD, CAT, GR, GST e G6PDH promovendo a remoção de ERO e consequentemente diminuindo a morte de células neuronais como descrito no estudo de Sarkar e Das (2006). Entretanto, no modelo de fatias de hipocampo não há grandes alterações na atividade das enzimas antioxidantes (Brongholi *et al.*, 2006), exceto pela elevação da SOD durante o período de isquemia. Este mecanismo de neuroproteção tem aplicação limitada ao modelo com fatias de hipocampo.

Outra propriedade importante da ação neuroprotetora da quercetina poderia ser considerada sobre insultos provocados por íons metálicos, tais como o cobre, ferro e Zn^{2+} , através da captação e neutralização destes. No estudo de Ha *et al.* (2003) a quercetina mostrou-se neuroprotetora em cultura de células corticais através da indução de insultos pela administração neurotóxica de $FeCl_2$ e $ZnCl_2$, evidenciando mais uma vez sua atividade antioxidante. A ação protetora da quercetina sobre insultos com íons metálicos, como o metilmercúrio (MeHg) e cloreto de mercúrio ($HgCl_2$), foram demonstrados em mitocôndrias do SNC (Franco *et al.*, 2007). A quercetina teve vários efeitos protetores, tais como contra a redução da viabilidade, redução na produção de H_2O_2 , e contra a peroxidação lipídica.

Uma das ações da quercetina é limitar o estresse oxidativo, como no exemplo da produção de H_2O_2 por mitocôndrias de córtex cerebral (Franco *et al.*, 2007), devido, provavelmente, ao seu papel antioxidante (Moskaug *et al.*, 2004). Neste sentido, a quercetina foi capaz de impedir a redução nos níveis de GSH *in vitro* (Franco *et al.*, 2007). A quercetina também restaurou a relação GSH/GSSG no cérebro de ratos submetidos a isquemia (Sarkar e Das, 2006). Sabendo-se desta capacidade da quercetina, poderia se esperar um efeito protetor quando os níveis de GSH-t foram

reduzidos no período de reperfusão. Ao contrário do esperado, a quercetina não produziu nenhum efeito neuroprotetor quanto a preservação dos níveis de GSH-t. Em sentido contrário, a quercetina na concentração de 100 μ M potencializou a redução nos níveis de PSH. Este dado condiz com a falta de proteção da concentração de 100 μ M contra a isquemia e a reperfusão. Neste sentido, altas concentrações de quercetina podem ser citotóxicas (Robaszkiewicz et al., 2007), além de poderem atuar de forma pró-oxidante (Metodiewa et al., 1999).

5.6. O papel neuroprotetor da quercetina no modelo de estresse oxidativo

Uma vez que a quercetina reduz a produção de H_2O_2 e protege mitocôndrias do SNC (Franco *et al.*, 2007), também foram realizados experimentos para observar a ação neuroprotetora da quercetina em um modelo de estresse oxidativo utilizando-se H_2O_2 diretamente aplicada no meio de incubação das fatias de hipocampo. Houve uma redução da viabilidade celular quando as fatias foram expostas a H_2O_2 (1,0 e 2,5 mM). A presença da quercetina 10 μ M impediu a redução na viabilidade causada por 1,0 mM de H_2O_2 , indicando uma tendência de neuroproteção. Esta tendência foi confirmada quando foi utilizada H_2O_2 2,5 mM, onde as concentrações de quercetina 30 e 100 μ M reverteram a queda na viabilidade causada pela H_2O_2 .

É importante ressaltar que a ação neuroprotetora da quercetina sobre o estresse oxidativo induzido por H_2O_2 , pode ser devido a sua capacidade de ativar moléculas intracelulares como cinases, fosfatases e fatores de transcrição, em ativar vias específicas de sinalização celular (Dajas *et al.*, 2003). No estudo de Chow *et al.* (2005)

foi possível verificar que a quercetina teve ação inibitória sobre a fosforilação da ERK (proteína envolvida na sinalização de sobrevivência celular), mas não das proteínas JNK e p38^{MAPK} (proteínas ativadas para promover apoptose celular), em macrófagos com aumento da expressão da proteína HO-1 (enzima que participa da proteção de macrófagos contra a morte celular apoptótica induzida por H₂O₂). Já Chen *et al.* (2006) demonstrou que a quercetina também diminuiu a fosforilação da ERK no insulto induzido por H₂O₂, com diminuição dos níveis da proteína p53 inibindo assim, a morte celular apoptótica em células C6 de gliomas. Em contrapartida Spencer *et al.* (2003), evidenciou que a quercetina pode induzir a morte neuronal via inibição direta da via de sobrevivência celular pela Akt/PKB e ERK mais do que uma indução da via de morte pela JNK, avaliado em cultura de células neuronais.

A determinação da liberação da LDH no meio de incubação das fatias, ao contrário do que foi observado no modelo de isquemia, resultou em dados inconsistentes, por esta razão, estes não foram apresentados. Talvez as alterações na permeabilidade celular causadas pela H₂O₂ sejam menos efetivas, como relatado em estudos com outros tipos de células (Dajas *et al.*, 2003; Chow *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2006). Estes mesmos estudos encontraram ação neuroprotetora da quercetina quando células foram expostas a H₂O₂ e demonstraram inibir eventos de morte celular característica de apoptose, com diminuição do potencial de membrana mitocondrial e liberação do citocromo C, bloqueio da ativação de proteínas pró-apoptóticas, como as caspases e da PARP, e com conseqüente redução na produção de ERO.

A ação da quercetina avaliada sobre as defesas antioxidantes demonstrou, como observado no modelo de isquemia *in vitro*, que esta também não foi capaz de reverter a queda nos níveis de GSH-t quando as fatias foram submetidas a H₂O₂ 1,0 e 2,5 mM. Esperava-se que devido a capacidade antioxidante da quercetina, esta pudesse agir

através da indução de GSH-t, melhorando assim as defesas celulares, favorecendo a reversão da toxicidade ocasionada pela H_2O_2 , como observado no estudo de Almeida (2007). Este estudo identificou um aumento substancial do conteúdo de GSH-t quando fatias de hipocampo de ratos foram tratadas com resveratrol, um conhecido flavonóide presente, particularmente, em vinhos tintos. Nossos dados apontam que a ação da quercetina contra H_2O_2 possa ser por mecanismos independentes da atividade da GSH-t. É conhecido da literatura que flavonóides, como a quercetina, ativam vias de sinalização que levam a ativação do elemento de transcrição associado a resposta a substâncias eletrofílicas (EpRE), anteriormente denominado elemento responsivo a antioxidantes (ARE) (Moskaug *et al.*, 2004), ativando a expressão de várias proteínas de defesa celular.

A quercetina ofereceu uma forte proteção, impedindo a redução da viabilidade e o aumento da liberação de LDH no modelo de isquemia. Um efeito neuroprotetor moderado, prevenindo a queda de viabilidade, também foi observado no modelo de estresse oxidativo. A quercetina, bem como o $ZnCl_2$, parecem acentuar a queda nos níveis de tióis quando estudado em fatias de hipocampo.

6. CONCLUSÕES

Experimentos com Zn^{2+} :

1. O tratamento dos animais *in vivo* com ZnCl_2 não protegeu as fatias de hipocampo de ratos submetidas ao modelo de isquemia *ex vivo*.
2. O ZnCl_2 não demonstrou ter ação direta sobre as defesas antioxidantes não-enzimáticas analisadas no modelo de isquemia *ex vivo*.
3. O ZnCl_2 demonstrou um efeito dual, ora sendo capaz de proteger fatias de hipocampo de ratos submetidas ao modelo de isquemia *in vitro*, ora apresentando efeito neurotóxico em suas maiores doses e em um maior período de isquemia.
4. O ZnCl_2 não demonstrou ter ação direta sobre as defesas antioxidantes não-enzimáticas analisadas no modelo de isquemia *in vitro*.
5. O ZnCl_2 foi capaz de inibir a atividade da enzima antioxidante GR, bem como seu inibidor específico o BCNU. Mas a atividade desta enzima não tem um papel primordial na neurotoxicidade da isquemia, pois sua inibição não alterou a resposta isquêmica.
6. O ZnCl_2 também não alterou a atividade das outras enzimas avaliadas (GPx, GST, GGT e G6PDH).

Experimentos com quercetina:

1. A quercetina apresentou uma forte ação neuroprotetora no modelo de isquemia *in vitro*, quando avaliados viabilidade e permeabilidade celular.
2. As defesas antioxidantes não-enzimáticas não sofreram alterações quando a quercetina foi administrada ao meio de incubação no modelo de isquemia *in vitro*.

3. Já no modelo de estresse oxidativo, a quercetina apresentou um moderado efeito neuroprotetor contra o H_2O_2 .
4. Como no modelo anterior não teve ação direta sobre as defesas antioxidantes não-enzimáticas no modelo de estresse oxidativo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aherne, S.A. and O'Brien, N.M. (2002) Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition*. **18**: 75-81.
- Ahmad, I.M., Aykin-Burns, N., Sim, J.E., Walsh, S.A., Higashikubo, R., Buettner, G.R., *et al* (2005) Mitochondrial O₂*- and H₂O₂ mediate glucose deprivation-induced stress in human cancer cells. *J Biol Chem*. **280**: 4254-4263.
- Akerboom, T.P. and Sies, H. (1981) Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol*. **77**: 373-382.
- Almeida, L.M.V. *Efeito do resveratrol em astrócitos: uma abordagem sobre parâmetros gliais específicos em cultura e em fatias hipocâmpais*. 118 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.
- Aruoma, O.I., Baborun, T. and Jen, L.S. (2003) Neuroprotection by bioactive components in medicinal and food plant extracts. *Mutat Res*. **544**: 203-215.
- Bains, J.S. and Shaw, C.A. (1997) Neurodegenerative disorders in humans: the role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal death. *Brain Res Brain Res Rev*. **25**: 335-358.
- Bishop, G.M., Dringen, R. and Robinson, S.R. (2007) Zinc stimulates the production of toxic reactive oxygen species (ROS) and inhibits glutathione reductase in astrocytes. *Free Radic Biol Med*. **42**: 1222-1230.
- Bonanni, L., Chachar, M., Jover-Mengual, T., Li, H., Jones, A., Yokota, H., *et al* (2006) Zinc-dependent multi-conductance channel activity in mitochondria isolated from ischemic brain. *J Neurosci*. **26**: 6851-6862.
- Boots, A.W., Li, H., Schins, R.P.F., Duffin, R., Heemskerk, J.W.M., Bast, A., *et al* (2007) The quercetin paradox. *Toxicol and Applies Pharmacol*. **222**: 89-96.

Borowski, C.F. *Papel do zinco no sistema nervoso central: defesas antioxidantes e sinalização celular via PI3K/AKT*. 81 f. Dissertação (Mestrado em Neurociências) - Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

Brocardo, P.S., Pandolfo, P., Takahashi, R.N., Rodrigues, A.L. and Dafre, A.L. (2005) Antioxidant defenses and lipid peroxidation in the cerebral cortex and hippocampus following acute exposure to malathion and/or zinc chloride. *Toxicology*. **207**: 283-291.

Brocardo, P.S., Assini, F., Franco, J.L., Pandolfo, P., Muller, Y.M., Takahashi, R.N., *et al* (2007) Zinc attenuates malathion-induced depressant-like behavior and confers neuroprotection in the rat brain. *Toxicol Sci*. **97**: 140-148.

Brongholi, K., Souza, D.G., Bainy, A.C., Dafre, A.L. and Tasca, C.I. (2006) Oxygen-glucose deprivation decreases glutathione levels and glutamate uptake in rat hippocampal slices. *Brain Res*. **1083**: 211-218.

Cai, A.L., Zipfel, G.J. and Sheline, C.T. (2006) Zinc neurotoxicity is dependent on intracellular NAD levels and the sirtuin pathway. *Eur J Neurosci*. **24**: 2169-2176.

Calderone, A., Jover, T., Mashiko, T., Noh, K.M., Tanaka, H., Bennett, M.V. and Zukin, R.S. (2004) Late calcium EDTA rescues hippocampal CA1 neurons from global ischemia-induced death. *J Neurosci*. **24**: 9903-9913.

Campagne, M.L., Thibodeaux, H., van Bruggen, N., Cairns, B., Gerlai, R., Palmer, J.T., *et al* (1999) Evidence for a protective role of metallothionein-1 in focal cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **96**: 12870-12875.

Campagne, M.V., Thibodeaux, H., van Bruggen, N., Cairns, B. and Lowe, D.G. (2000) Increased binding activity at an antioxidant-responsive element in the metallothionein-1 promoter and rapid induction of metallothionein-1 and -2 in response to cerebral ischemia and reperfusion. *J Neurosci*. **20**: 5200-5207.

Carlberg, I. and Mannervik, B. (1985) Glutathione reductase. *Methods Enzymol*. **113**: 484-490.

Chan, P.H. (1996) Role of oxidants in ischemic brain damage. *Stroke*. **27**: 1124-1129.

- Chen, C.J., Liao, S.L. and Kuo, J.S. (2000) Gliotoxic action of glutamate on cultured astrocytes. *J Neurochem.* **75**: 1557-1565.
- Chen, C.J. and Liao, S.L. (2003) Neurotrophic and neurotoxic effects of zinc on neonatal cortical neurons. *Neurochem Int.* **42**: 471-479.
- Chen, T.J., Jeng, J.Y., Lin, C.W., Wu, C.Y. and Chen, Y.C. (2006) Quercetin inhibition of ROS-dependent and -independent apoptosis in rat glioma C6 cells. *Toxicology.* **223**: 113-126.
- Cho, J.Y., Kim, I.S., Jang, Y.H., Kim, A.R. and Lee, S.R. (2006) Protective effect of quercetin, a natural flavonoid against neuronal damage after transient global cerebral ischemia. *Neurosci Lett.* **404**: 330-335.
- Choi, D.W. and Koh, J.Y. (1998) Zinc and brain injury. *Annu Rev Neurosci.* **21**: 347-375.
- Chow, J.M., Shen, S.C., Huan, S.K., Lin, H.Y. and Chen, Y.C. (2005) Quercetin, but not rutin and quercitrin, prevention of H₂O₂-induced apoptosis via anti-oxidant activity and heme oxygenase 1 gene expression in macrophages. *Biochem Pharmacol.* **69**: 1839-1851.
- Colvin, R.A., Davis, N., Nipper, R.W. and Carter, P.A. (2000) Zinc transport in the brain: routes of zinc influx and efflux in neurons. *J Nutr.* **130**: 1484S-1487S.
- Colvin, R.A., Fontaine, C.P., Laskowski, M. and Thomas, D. (2003) Zn²⁺ transporters and Zn²⁺ homeostasis in neurons. *Eur J Pharmacol.* **479**: 171-185.
- Cote, A., Chiasson, M., Peralta, M.R., 3rd, Lafortune, K., Pellegrini, L. and Toth, K. (2005) Cell type-specific action of seizure-induced intracellular zinc accumulation in the rat hippocampus. *J Physiol.* **566**: 821-837.
- Cotelle, N. (2001) Role of flavonoids in oxidative stress. *Curr Top Med Chem.* **1**: 569-590.
- Cuajungco, M.P. and Lees, G.J. (1998) Nitric oxide generators produce accumulation of chelatable zinc in hippocampal neuronal perikarya. *Brain Res.* **799**: 118-129.

Dafre, A.L. *S-Tiolação protéica como estratégia antioxidante e de regulação enzimática. Hemoglobina e glutathione S-transferase microssomal como modelo*. 141 f. Tese (Doutorado em Fisiologia) - Programa de Pós-Graduação em Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1996.

Dafre, A.L., Arteni, N.S., Siqueira, I.R. and Netto, C.A. (2003) Perturbations in the thiol homeostasis following neonatal cerebral hypoxia-ischemia in rats. *Neurosci Lett*. **345**: 65-68.

Dajas, F., Rivera-Megret, F., Blasina, F., Arredondo, F., Abin-Carriquiry, J.A., Costa, G., *et al* (2003) Neuroprotection by flavonoids. *Braz J Med Biol Res*. **36**: 1613-1620.

Danbolt, N.C. (2001) Glutamate uptake. *Prog Neurobiol*. **65**: 1-105.

Davis, W., Jr., Ronai, Z. and Tew, K.D. (2001) Cellular thiols and reactive oxygen species in drug-induced apoptosis. *J Pharmacol Exp Ther*. **296**: 1-6.

De Ruvo, C., Amodio, R., Algeri, S., Martelli, N., Intilangelo, A., D'Ancona, G.M. and Esposito, E. (2000) Nutritional antioxidants as antidegenerative agents. *Int J Dev Neurosci*. **18**: 359-366.

Dineley, K.E., Brocard, J.B. and Reynolds, I.J. (2002) Elevated intracellular zinc and altered proton homeostasis in forebrain neurons. *Neuroscience*. **114**: 439-449.

Dringen, R., Kussmaul, L., Gutterer, J.M., Hirrlinger, J. and Hamprecht, B. (1999) The glutathione system of peroxide detoxification is less efficient in neurons than in astroglial cells. *J Neurochem*. **72**: 2523-2530.

Dringen, R. (2000) Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog Neurobiol*. **62**: 649-671.

Facchinetti, F., Dawson, V.L. and Dawson, T.M. (1998) Free radicals as mediators of neuronal injury. *Cell Mol Neurobiol*. **18**: 667-682.

Franco, J.L., Trivella, D.B., Trevisan, R., Dinslaken, D.F., Marques, M.R., Bainy, A.C. and Dafre, A.L. (2006) Antioxidant status and stress proteins in the gills of the brown mussel *Perna perna* exposed to zinc. *Chem Biol Interact*. **160**: 232-240.

- Franco, J.L., Posser, T., Brocardo, P.S., Trevisan, R., Uliano-Silva, M., Gabilan, N.H., Santos, A.R.S., Leal, R.B., Rodrigues, A.L.S., Farina, M., Dafre, A.L. (2008a) Involvement of glutathione, ERK1/2 phosphorylation and BDNF expression in the antidepressant-like effect of zinc in rats. *Behav Brain Res.* **188**: 316-323.
- Franco, J.L.P., T. ; Mattos, J. J. ; Sanchez-Chardi, A. ; Trevisan, R.; Oliveira, C. S. ; Carvalho, P.S.M. ; Leal, R. B. ; Marques, M.R.F. ; Bairy, A.C.D. ; Dafre, A. L. (2008b) Biochemical alterations in juvenile Carp (*Cyprinus carpio*) exposed to zinc: Glutathione reductase as a target. *Mar Environ Res.* **Doi**: 10.1016/j.marenvres.2008.02.031.
- Franco, J.L.B., H. C. ; Stringari, J. ; Missau, F. ; Posser, T. ; Mendes, B. ; Leal, R. B. ; Santos, A.R.S. ; Dafre, A. L. ; Pizzolati, M. G. ; Farina, M. (2007) Mercurial-induced hydrogen peroxide generation in mouse brain mitochondria: protective effects of quercetin. *Chem Res Toxicol.* **20**: 1919-1926.
- Frazzini, V., Rapposelli, I.G., Corona, C., Rockabrand, E., Canzoniero, L.M. and Sensi, S.L. (2007) Mild acidosis enhances AMPA receptor-mediated intracellular zinc mobilization in cortical neurons. *Mol Med.* **13**: 356-361.
- Frederickson, C.J., Suh, S.W., Silva, D., Frederickson, C.J. and Thompson, R.B. (2000) Importance of zinc in the central nervous system: the zinc-containing neuron. *J Nutr.* **130**: 1471S-1483S.
- Frederickson, C.J., Cuajungco, M.P., LaBuda, C.J. and Suh, S.W. (2002) Nitric oxide causes apparent release of zinc from presynaptic boutons. *Neuroscience.* **115**: 471-474.
- Frederickson, C.J., Koh, J.Y. and Bush, A.I. (2005) The neurobiology of zinc in health and disease. *Nat Rev Neurosci.* **6**: 449-462.
- Galasso, S.L. and Dyck, R.H. (2007) The role of zinc in cerebral ischemia. *Mol Med.* **13**: 380-387.
- Glock, G.E. and Mc, L.P. (1953) Further studies on the properties and assay of glucose 6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of rat liver. *Biochem J.* **55**: 400-408.

- Griffin, S., Clark, J.B. and Canevari, L. (2005) Astrocyte-neurone communication following oxygen-glucose deprivation. *J Neurochem.* **95**: 1015-1022.
- Ha, H.J., Kwon, Y.S., Park, S.M., Shin, T., Park, J.H., Kim, H.C., *et al* (2003) Quercetin attenuates oxygen-glucose deprivation- and excitotoxin-induced neurotoxicity in primary cortical cell cultures. *Biol Pharm Bull.* **26**: 544-546.
- Habig, W.H. and Jakoby, W.B. (1981) Assays for differentiation of glutathione S-transferases. *Methods Enzymol.* **77**: 398-405.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (2007) *Free Radicals in Biology and Medicine*. New York: Oxford.
- Hayashi, T., Saito, A., Okuno, S., Ferrand-Drake, M., Dodd, R.L., Nishi, T., *et al* (2003) Oxidative damage to the endoplasmic reticulum is implicated in ischemic neuronal cell death. *J Cereb Blood Flow Metab.* **23**: 1117-1128.
- Hayashi, T., Saito, A., Okuno, S., Ferrand-Drake, M., Dodd, R.L. and Chan, P.H. (2005) Damage to the endoplasmic reticulum and activation of apoptotic machinery by oxidative stress in ischemic neurons. *J Cereb Blood Flow Metab.* **25**: 41-53.
- Hellmich, H.L., Frederickson, C.J., DeWitt, D.S., Saban, R., Parsley, M.O., Stephenson, R., *et al* (2004) Protective effects of zinc chelation in traumatic brain injury correlate with upregulation of neuroprotective genes in rat brain. *Neurosci Lett.* **355**: 221-225.
- Hu, M.L. (1994) Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. *Methods Enzymol.* **233**: 380-385.
- Ishige, K., Schubert, D. and Sagara, Y. (2001) Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. *Free Radic Biol Med.* **30**: 433-446.
- Jacobsson, S.O. and Fowler, C.J. (1999) Dopamine and glutamate neurotoxicity in cultured chick telencephali cells: effects of NMDA antagonists, antioxidants and MAO inhibitors. *Neurochem Int.* **34**: 49-62.
- Kanai, Y. and Hediger, M.A. (2003) The glutamate and neutral amino acid transporter family: physiological and pharmacological implications. *Eur J Pharmacol.* **479**: 237-247.

- Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessel, T.M. (2003) *Princípios da Neurociência*. São Paulo: Manole.
- Kang, S.S., Lee, J.Y., Choi, Y.K., Song, S.S., Kim, J.S., Jeon, S.J., *et al* (2005) Neuroprotective effects of naturally occurring biflavonoids. *Bioorg Med Chem Lett.* **15**: 3588-3591.
- Katsumori, H., Baldwin, R.A. and Wasterlain, C.G. (1999) Reverse transport of glutamate during depolarization in immature hippocampal slices. *Brain Res.* **819**: 160-164.
- Kehrer, J.P. (1983) The effect of BCNU (carmustine) on tissue glutathione reductase activity. *Toxicol Lett.* **17**: 63-68.
- Knekt, P., Kumpulainen, J., Jarvinen, R., Rissanen, H., Heliovaara, M., Reunanen, A., *et al* (2002) Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am J Clin Nutr.* **76**: 560-568.
- Kosower, N.S. and Kosower, E.M. (1978) The glutathione status of cells. *Int Rev Cytol.* **54**: 109-160.
- Kroon, P.A., Clifford, M.N., Crozier, A., Day, A.J., Donovan, J.L., Manach, C. and Williamson, G. (2004) How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols in vitro? *Am J Clin Nutr.* **80**: 15-21.
- Kwak, S. and Weiss, J.H. (2006) Calcium-permeable AMPA channels in neurodegenerative disease and ischemia. *Curr Opin Neurobiol.* **16**: 281-287.
- Larsen, G.A., Skjellegrind, H.K., Berg-Johnsen, J., Moe, M.C. and Vinje, M.L. (2006) Depolarization of mitochondria in isolated CA1 neurons during hypoxia, glucose deprivation and glutamate excitotoxicity. *Brain Res.* **1077**: 153-160.
- Lee, J.Y., Cole, T.B., Palmiter, R.D. and Koh, J.Y. (2000) Accumulation of zinc in degenerating hippocampal neurons of ZnT3-null mice after seizures: evidence against synaptic vesicle origin. *J Neurosci.* **20**: RC79.
- Lee, J.Y., Kim, Y.H. and Koh, J.Y. (2001) Protection by pyruvate against transient forebrain ischemia in rats. *J Neurosci.* **21**: RC171.

- Lee, D.H., O'Connor, T.R. and Pfeifer, G.P. (2002a) Oxidative DNA damage induced by copper and hydrogen peroxide promotes CG-->TT tandem mutations at methylated CpG dinucleotides in nucleotide excision repair-deficient cells. *Nucleic Acids Res.* **30**: 3566-3573.
- Lee, J.M., Zipfel, G.J., Park, K.H., He, Y.Y., Hsu, C.Y. and Choi, D.W. (2002b) Zinc translocation accelerates infarction after mild transient focal ischemia. *Neuroscience*. **115**: 871-878.
- Leker, R.R. and Shohami, E. (2002) Cerebral ischemia and trauma-different etiologies yet similar mechanisms: neuroprotective opportunities. *Brain Res Brain Res Rev.* **39**: 55-73.
- Liu, S., Lau, L., Wei, J., Zhu, D., Zou, S., Sun, H.S., *et al* (2004) Expression of Ca(2+)-permeable AMPA receptor channels primes cell death in transient forebrain ischemia. *Neuron*. **43**: 43-55.
- Maher, P., Salgado, K.F., Zivin, J.A. and Lapchak, P.A. (2007) A novel approach to screening for new neuroprotective compounds for the treatment of stroke. *Brain Res.* **1173**: 117-125.
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A. and Remesy, C. (2005) Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr.* **81**: 230S-242S.
- Mandel, S.A., Avramovich-Tirosh, Y., Reznichenko, L., Zheng, H., Weinreb, O., Amit, T. and Youdim, M.B. (2005) Multifunctional activities of green tea catechins in neuroprotection. Modulation of cell survival genes, iron-dependent oxidative stress and PKC signaling pathway. *Neurosignals*. **14**: 46-60.
- Maret, W. (1998) The glutathione redox state and zinc mobilization from metallothionein and other proteins with zinc-sulfur coordination sites. In *Glutathione in the nervous system*. Shaw, C.A. (ed.) Washington: Taylor and Francis, pp. 257-274.
- Martindale, J.L. and Holbrook, N.J. (2002) Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol.* **192**: 1-15.

- Matsushita, K., Kitagawa, K., Matsuyama, T., Ohtsuki, T., Taguchi, A., Mandai, K., *et al* (1996) Effect of systemic zinc administration on delayed neuronal death in the gerbil hippocampus. *Brain Res.* **743**: 362-365.
- Mattson, M.P. (2000) Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **1**: 120-129.
- Meister, A., Tate, S.S. and Griffith, O.W. (1981) Gamma-glutamyl transpeptidase. *Methods Enzymol.* **77**: 237-253.
- Meldrum, B.S. (2000) Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J Nutr.* **130**: 1007S-1015S.
- Metodiewa, D., Jaiswal, A.K., Cenas, N., Dickanaitė, E. and Segura-Aguilar, J. (1999) Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product. *Free Radic Biol Med.* **26**: 107-116.
- Miralles, V.J., Martinez-Lopez, I., Zaragoza, R., Borrás, E., Garcia, C., Pallardo, F.V. and Vina, J.R. (2001) Na⁺ dependent glutamate transporters (EAAT1, EAAT2, and EAAT3) in primary astrocyte cultures: effect of oxidative stress. *Brain Res.* **922**: 21-29.
- Mize, C.E. and Langdon, R.G. (1962) Hepatic glutathione reductase. I. Purification and general kinetic properties. *J Biol Chem.* **237**: 1589-1595.
- Mocchegiani, E., Bertoni-Freddari, C., Marcellini, F. and Malavolta, M. (2005) Brain, aging and neurodegeneration: role of zinc ion availability. *Prog Neurobiol.* **75**: 367-390.
- Molz, S., Decker, H., Dal-Cim, T., Cremonez, C., Cordova, F.M., Leal, R.B. and Tasca, C.I. (2008) Glutamate-induced Toxicity in Hippocampal Slices Involves Apoptotic Features and p38(MAPK) Signaling. *Neurochem Res.* **33**: 27-36.
- Monje, M.L., Chatten-Brown, J., Hye, S.E. and Raley-Susman, K.M. (2000) Free radicals are involved in the damage to protein synthesis after anoxia/aglycemia and NMDA exposure. *Brain Res.* **857**: 172-182.
- Moskaug, J.O., Carlsen, H., Myhrstad, M. and Blomhoff, R. (2004) Molecular imaging of the biological effects of quercetin and quercetin-rich foods. *Mech Ageing Dev.* **125**: 315-324.

- Murota, K. and Terao, J. (2003) Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism. *Arch Biochem Biophys.* **417**: 12-17.
- Naidu, P.S., Singh, A. and Kulkarni, S.K. (2003) Quercetin, a bioflavonoid, attenuates haloperidol-induced orofacial dyskinesia. *Neuropharmacology.* **44**: 1100-1106.
- Ni, Y., Malarkey, E.B. and Parpura, V. (2007) Vesicular release of glutamate mediates bidirectional signaling between astrocytes and neurons. *J Neurochem.* **103**: 1273-1284.
- Nieoullon, A., Canolle, B., Masméjan, F., Guillet, B., Pisano, P. and Lortet, S. (2006) The neuronal excitatory amino acid transporter EAAC1/EAAT3: does it represent a major actor at the brain excitatory synapse? *J Neurochem.* **98**: 1007-1018.
- Noh, K.M., Kim, Y.H. and Koh, J.Y. (1999) Mediation by membrane protein kinase C of zinc-induced oxidative neuronal injury in mouse cortical cultures. *J Neurochem.* **72**: 1609-1616.
- Noh, K.M., Yokota, H., Mashiko, T., Castillo, P.E., Zukin, R.S. and Bennett, M.V. (2005) Blockade of calcium-permeable AMPA receptors protects hippocampal neurons against global ischemia-induced death. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **102**: 12230-12235.
- Okamoto, T. (2005) Safety of quercetin for clinical application (Review). *Int J Mol Med.* **16**: 275-278.
- Oliveira, C.S. *Ação do zinco sobre os mecanismos moleculares de sinalização celular no hipocampo.* 49 f. Monografia (Graduação) – Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.
- Pastore, A., Federici, G., Bertini, E. and Piemonte, F. (2003) Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin Chim Acta.* **333**: 19-39.
- Phillis, J.W., Ren, J. and O'Regan, M.H. (2000) Transporter reversal as a mechanism of glutamate release from the ischemic rat cerebral cortex: studies with DL-threo-beta-benzyloxyaspartate. *Brain Res.* **868**: 105-112.
- Pocock, J.M. and Nicholls, D.G. (1998) Exocytotic and nonexocytotic modes of glutamate release from cultured cerebellar granule cells during chemical ischaemia. *J Neurochem.* **70**: 806-813.

- Polat, C., Tokyol, C., Kahraman, A., Sabuncuoglu, B. and Yilmaz, S. (2006) The effects of desferrioxamine and quercetin on hepatic ischemia-reperfusion induced renal disturbance. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. **74**: 379-383.
- Prior, R.L. (2003) Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. *Am J Clin Nutr*. **78**: 570S-578S.
- Pu, F., Mishima, K., Irie, K., Motohashi, K., Tanaka, Y., Orito, K., *et al* (2007) Neuroprotective effects of quercetin and rutin on spatial memory impairment in an 8-arm radial maze task and neuronal death induced by repeated cerebral ischemia in rats. *J Pharmacol Sci*. **104**: 329-334.
- Robaszkiewicz, A., Balcerczyk, A. and Bartosz, G. (2007) Antioxidative and prooxidative effects of quercetin on A549 cells. *Cell Biol Int*. **31**: 1245-1250.
- Sandstead, H.H., Frederickson, C.J. and Penland, J.G. (2000) History of zinc as related to brain function. *J Nutr*. **130**: 496S-502S.
- Sarkar, S. and Das, N. (2006) Mannosylated liposomal flavonoid in combating age-related ischemia-reperfusion induced oxidative damage in rat brain. *Mech Ageing Dev*. **127**: 391-397.
- Scalbert, A. and Williamson, G. (2000) Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr*. **130**: 2073S-2085S.
- Schild, L. and Reiser, G. (2005) Oxidative stress is involved in the permeabilization of the inner membrane of brain mitochondria exposed to hypoxia/reoxygenation and low micromolar Ca²⁺. *Febs J*. **272**: 3593-3601.
- Sensi, S.L., Rockabrand, E. and Canzoniero, L.M. (2006) Acidosis enhances toxicity induced by kainate and zinc exposure in aged cultured astrocytes. *Biogerontology*. **7**: 367-374.
- Shabanzadeh, A.P., Shuaib, A., Yang, T., Salam, A. and Wang, C.X. (2004) Effect of zinc in ischemic brain injury in an embolic model of stroke in rats. *Neurosci Lett*. **356**: 69-71.
- Shaw, C.A. (1998) *Glutathione in the nervous system*. Washington: Taylor and Francis.

- Sies, H. (1997) Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol.* **82**: 291-295.
- Singh, D., Chander, V. and Chopra, K. (2004) The effect of quercetin, a bioflavonoid on ischemia/reperfusion induced renal injury in rats. *Arch Med Res.* **35**: 484-494.
- Spencer, J.P., Rice-Evans, C. and Williams, R.J. (2003) Modulation of pro-survival Akt/protein kinase B and ERK1/2 signaling cascades by quercetin and its in vivo metabolites underlie their action on neuronal viability. *J Biol Chem.* **278**: 34783-34793.
- Stork, C.J. and Li, Y.V. (2006) Intracellular zinc elevation measured with a "calcium-specific" indicator during ischemia and reperfusion in rat hippocampus: a question on calcium overload. *J Neurosci.* **26**: 10430-10437.
- Suh, S.W., Jensen, K.B., Jensen, M.S., Silva, D.S., Kesslak, P.J., Danscher, G. and Frederickson, C.J. (2000a) Histochemically-reactive zinc in amyloid plaques, angiopathy, and degenerating neurons of Alzheimer's diseased brains. *Brain Res.* **852**: 274-278.
- Suh, S.W., Chen, J.W., Motamedi, M., Bell, B., Listiak, K., Pons, N.F., *et al* (2000b) Evidence that synaptically-released zinc contributes to neuronal injury after traumatic brain injury. *Brain Res.* **852**: 268-273.
- Takeda, A., Minami, A., Seki, Y. and Oku, N. (2003) Inhibitory function of zinc against excitation of hippocampal glutamatergic neurons. *Epilepsy Res.* **57**: 169-174.
- Takeda, A., Nakajima, S., Fuke, S., Sakurada, N., Minami, A. and Oku, N. (2006) Zinc release from Schaffer collaterals and its significance. *Brain Res Bull.* **68**: 442-447.
- Takizawa, S., Fukuyama, N., Hirabayashi, H., Kohara, S., Kazahari, S., Shinohara, Y. and Nakazawa, H. (2003) Quercetin, a natural flavonoid, attenuates vacuolar formation in the optic tract in rat chronic cerebral hypoperfusion model. *Brain Res.* **980**: 156-160.
- Tan, S., Wood, M. and Maher, P. (1998) Oxidative stress induces a form of programmed cell death with characteristics of both apoptosis and necrosis in neuronal cells. *J Neurochem.* **71**: 95-105.

- Tietze, F. (1969) Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem.* **27**: 502-522.
- Trotti, D., Danbolt, N.C. and Volterra, A. (1998) Glutamate transporters are oxidant-vulnerable: a molecular link between oxidative and excitotoxic neurodegeneration? *Trends Pharmacol Sci.* **19**: 328-334.
- Tsuda, M., Imaizumi, K., Katayama, T., Kitagawa, K., Wanaka, A., Tohyama, M. and Takagi, T. (1997) Expression of zinc transporter gene, ZnT-1, is induced after transient forebrain ischemia in the gerbil. *J Neurosci.* **17**: 6678-6684.
- Voet, D.; Voet, J. G.; Pratt, C. W. Fundamentos de Bioquímica. Porto Alegre. Artmed, 2000.
- Wang, X.F. and Cynader, M.S. (2000) Astrocytes provide cysteine to neurons by releasing glutathione. *J Neurochem.* **74**: 1434-1442.
- Wei, G., Hough, C.J., Li, Y. and Sarvey, J.M. (2004) Characterization of extracellular accumulation of Zn²⁺ during ischemia and reperfusion of hippocampus slices in rat. *Neuroscience.* **125**: 867-877.
- Wendel, A. (1981) Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* **77**: 325-333.
- Whitaker, J.F. (1969) A general colorimetric procedure for the estimation of enzymes which are linked to the NADH-NAD⁺ system. *Clin Chim Acta.* **24**: 23-37.
- White, B.C., Sullivan, J.M., DeGracia, D.J., O'Neil, B.J., Neumar, R.W., Grossman, L.I., *et al* (2000) Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. *J Neurol Sci.* **179**: 1-33.
- Williams, R.J., Spencer, J.P. and Rice-Evans, C. (2004) Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radic Biol Med.* **36**: 838-849.
- Yanagitani, S., Miyazaki, H., Nakahashi, Y., Kuno, K., Ueno, Y., Matsushita, M., *et al* (1999) Ischemia induces metallothionein III expression in neurons of rat brain. *Life Sci.* **64**: 707-715.

Yeh, T.H., Hwang, H.M., Chen, J.J., Wu, T., Li, A.H. and Wang, H.L. (2005) Glutamate transporter function of rat hippocampal astrocytes is impaired following the global ischemia. *Neurobiol Dis.* **18**: 476-483.

Yin, H.Z., Sensi, S.L., Ogoshi, F. and Weiss, J.H. (2002) Blockade of Ca^{2+} -permeable AMPA/kainate channels decreases oxygen-glucose deprivation-induced Zn^{2+} accumulation and neuronal loss in hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci.* **22**: 1273-1279.

Zhang, M., Ning, G.M., Hong, D.H., Yang, Y., Kutor, J. and Zheng, X.X. (2003) The influence of oxygen-glucose deprivation on nitric oxide and intracellular Ca^{2+} in cultured hippocampal neurons. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)*. **35**: 561-566.